

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. E. Mayatepek

**Diagnostik der Ahornsirupkrankheit (MSUD)
mit besonderer Betrachtung
der Mutationsanalyse
der *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gene**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

Sarah Fend

2010

Als Inauguraldissertation
gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Univ.-Prof. Dr. Wendel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rieder

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
I. Einleitung	1
1.1 Die Ahornsirupkrankheit (MSUD)	1
1.2 Biochemische Grundlagen der Ahornsirupkrankheit (MSUD)	2
1.3 Klinische Phänotypen der MSUD	8
1.4 Diagnostik	12
1.5 Therapie	15
1.6 Zielsetzung	17
II. Patienten, Material und Methoden	18
2.1 Patienten	18
2.2 Vorgehen bei der phänotypischen Zuordnung der Patienten	19
2.3 Material	20
2.4 Methoden	20
III. Ergebnisse	27
3.1 Beschreibung der Patienten und Bewertung des jeweiligen Schweregrades der MSUD	27
3.2 Genotypen der molekulargenetisch untersuchten Patienten	40
IV. Diskussion	60
4.1 Zur phänotypischen Zuordnung der Patienten vor Durchführung der Mutationsanalytik	60
4.2 Mögliche Konsequenzen der gefunden Mutationen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der E1- (E1 α - und E1 β -) und E2- Untereinheiten des BCKDH-Multienzymkomplexes	65
4.3 Bedeutung der Mutationsanalytik für die Diagnosestellung der MSUD	86
4.4 Mögliche Gründe für negative Ergebnisse der hier durchgeführten Mutationsanalyse	91

4.5	Zur Diskussion eines Algorithmus für die Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf eine MSUD aus dem Neugeborenenenscreening	92
V.	Zusammenfassung.....	96
VI.	Literaturverzeichnis	102
VII.	Anhang	113
	Abstract.....	115
	Veröffentlichung	116
	Danksagung	117
	Eidesstattliche Versicherung	118
	Lebenslauf.....	119

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Allo-Ile	Allo-Isoleucin
Å	Ångström (= 10^{-10} m)
α -KGDH	α -Ketoglutarat-Dehydrogenase
BCAA	Branched-chain amino acids
BCKA	Branched-chain α -ketoacids
BCKDH	Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase
<i>BCKDHA</i>	Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase, alpha Polypeptide
<i>BCKDHB</i>	Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase, beta Polypeptide
<i>BCKDK</i>	Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase kinase
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CT	Computertomographie
D	Deutschland
<i>DBT</i>	Dihydrolipoamide branched chain transacylase
ddNTPs	Didesoxynucleotidtriphosphate
<i>DLD</i>	Dihydrolipoamide dehydrogenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynucleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroencephalogramm
G	Guanin
HPLC	High performance liquid chromatography
ht.	heterozygot

Ile	Isoleucin
KIC	α -Ketoisocaproinsäure
KIV	α -Ketoisovaleriansäure
KMV	α -Keto- β -Methylvaleriansäure
Leu	Leucin
LIB	Libanon
m	männlich
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MSUD	Maple Syrup Urine Disease
MTA	Medizinisch-technische Angestellte
n.b.	nicht bestimmt
NBS	Neugeborenenenscreening
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDH	Pyruvat-Dehydrogenase
RUS	Russland
SSW.	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
TR	Türkei
V	Volt
Val	Valin
w	weiblich
wt.	Wildtyp

I. Einleitung

1.1 Die Ahornsirupkrankheit (MSUD)

Die Ahornsirupkrankheit ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit, der eine Abbaustörung der verzweigtkettigen Aminosäuren (branched-chain amino acids, BCAA) Leucin, Isoleucin und Valin zugrunde liegt. Diese Aminosäuren und ihre korrespondierenden α -Ketosäuren (branched-chain α -ketoacids, BCKA) akkumulieren in den Körperflüssigkeiten (*Chuang & Shih, 2001*). Die Ursache sind aktivitätsvermindernde Veränderungen des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (branched-chain α -ketoacid dehydrogenase, BCKDH).

Die erste Beschreibung von Patienten mit Ahornsirupkrankheit erfolgte 1954 (*Menkes et al., 1954*). Zusätzlich zu schweren neurologischen Symptomen fiel bei den betroffenen Kindern ein süßlicher, an Ahornsirup erinnernder Urin- und Körpergeruch auf. Dies führte zur Namensgebung der Stoffwechselkrankheit, die im Englischen Maple Syrup Urine Disease (MSUD) heißt (*Westall et al., 1957*). Heute weiß man, dass für den Geruch die Substanz Sotolone aus dem Isoleucin-Intermediärstoffwechsel, verantwortlich ist (*Podebrad et al., 1999*). Sotolone ist auch in Ahornsirup enthalten.

Die geschätzte Inzidenz der Ahornsirupkrankheit liegt weltweit bei 1:185.000 Neugeborenen (*Chuang & Shih, 2001*). Es gibt für einige ethnische Gruppen besonders hohe Manifestationsraten. So liegen die Inzidenzen in der Population der Mennoniten in den USA mit etwa 1:200 Neugeborenen (*Marshall & DiGeorge, 1981*) und bei aschkenasischen Juden mit etwa 1:113 Neugeborenen (*Edelmann et al., 2001*) aufgrund von Foundereffekten sehr viel höher. In Populationen mit der Tradition der konsanguinen Eheschließung sind die Inzidenzen ebenfalls hoch. Für die Türkei wird beispielsweise eine Inzidenz von 1:50.000 Neugeborenen angegeben (*Dursun et al., 2002*).

1.2 **Biochemische Grundlagen der Ahornsirupkrankheit (MSUD)**

1.2.1 **Der BCKDH-Multienzymkomplex**

Das Enzym BCKDH liegt als Multienzymkomplex vor und befindet sich an der inneren Mitochondrienmembran aller Gewebe (*Yeaman, 1986*). Es setzt sich aus fünf katalytischen Untereinheiten zusammen. Diese sind die E1-, E2- und E3-Untereinheit, eine Kinase und eine Phosphatase.

Die E1-Untereinheit ist eine Thiaminpyrophosphat-abhängige BCKA-Decarboxylase, die als Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$) mit einer molekularen Masse von 170 kDa (E1 α : 91 kDa, E1 β : 75,6 kDa) vorliegt. Die Untereinheit E1 α dieses Heterotetramers wird durch das *BCKDHA*-Gen kodiert, welches auf Chromosom 19 (19q13.1-q13.2) liegt (*Crabb et al., 1989; Fekete et al., 1989*). Die E1 β -Untereinheit wird durch das *BCKDHB*-Gen auf Chromosom 6 (6q14) kodiert (*Edelmann et al., 2001*).

Die E2-Untereinheit ist eine Dihydrolipoyl-Transacylase, die als Homopolymer (α_{24}) mit einer molekularen Masse von 46,7 kDa vorliegt. Sie wird durch das *DBT*-Gen kodiert, welches auf Chromosom 1 (1p31) liegt (*Herring et al., 1991; Lau et al., 1991; Zneimer et al., 1991*).

Die E3-Untereinheit ist eine Dihydrolipoyl-Dehydrogenase, die als Homodimer (α_2) mit einer molekularen Masse von 110,0 kDa vorliegt. Sie wird durch das *DLD*-Gen kodiert, welches auf Chromosom 7 (7q31-q32) liegt (*Scherer et al., 1991*).

Die inaktivierende Kinase und die aktivierende Phosphatase sind zwei Enzyme, die spezifisch die Aktivität des Enzymkomplexes regulieren. Die Kinase mit einer molekularen Masse von 43,0 kDa wird durch das *BCKDK*-Gen auf Chromosom 16 (16p11.2) kodiert (*Chuang et al., 2002*).

Der Phosphatase mit einer molekularen Masse von 460,0 kDa konnte lange kein kodierendes Gen zugewiesen werden. Es scheint sich hierbei um die Protein-Phosphatase 2Cm zu handeln, die durch das *PP2Cm*-Gen (auch *PPM1K*-Gen genannt) kodiert wird (*Lu et al., 2009*).

Die 24 kubisch angeordneten Kopien der E2-Untereinheit bilden den Kern des Multienzymkomplexes. Um den Kern herum lagern sich zwölf Kopien der E1- und sechs Kopien der E3-Untereinheit (*Ævarsson et al., 2000*). Die Phosphatase und Kinase sind über Ionenbindungen mit der E1-Untereinheit verbunden (*Chuang & Shih, 2001*). **Abbildung 1.1** zeigt die Anordnung der katalytischen Untereinheiten innerhalb des BCKDH-Multienzymkomplexes.

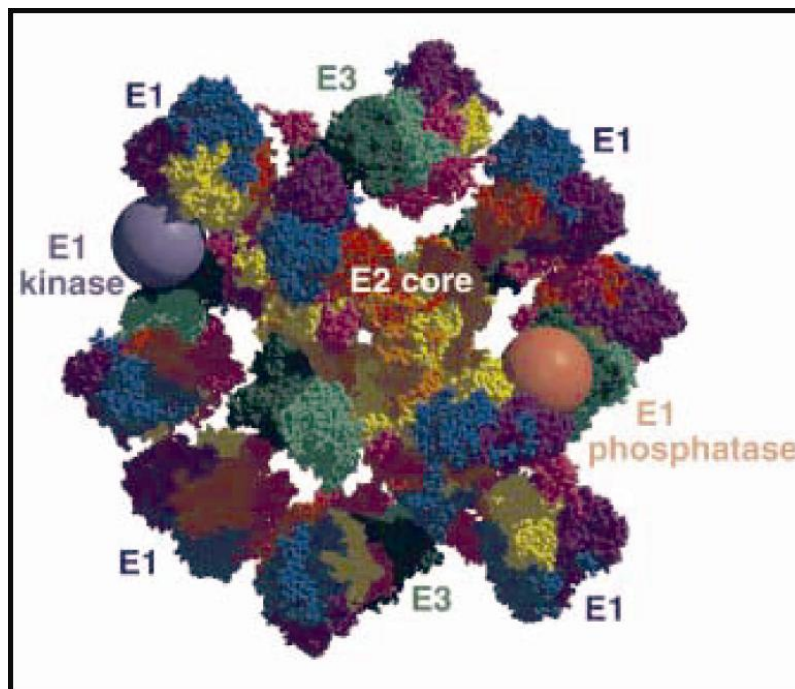


Abbildung 1.1: Der BCKDH-Multienzymkomplex (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*).

Während die E1- und E2-Untereinheiten spezifisch für die BCKA-Dekarboxylierung sind, ist die E3-Untereinheit Bestandteil einer Enzymfamilie aus insgesamt drei hoch konservierten α -Ketosäuren-Dehydrogenasen mit ähnlicher Struktur und Funktion. Neben der BCKDH ist sie Bestandteil auch der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (α -KGDH). Ein genetischer Defekt, der zu einer Aktivitätsminderung der E3-Untereinheit führt, ist ein eigenständiges Krankheitsbild, bei dem zusätzlich zu den BCAA und BCKA auch Pyruvat, Laktat und α -Ketoglutarat akkumulieren (*Chuang & Shih, 2001*). Dieser Dihydrolipoyl-Dehydrogenase-Mangel (oder E3-Mangel) findet im Rahmen dieser Arbeit keine Berücksichtigung.

Die spezifische Kinase und die spezifische Phosphatase sind Teil der Aktivitätsregulierung des BCKDH-Komplexes (*Reed et al., 1985*). Dabei findet die

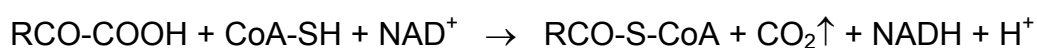
Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung an einem Serinrest innerhalb der E1 α -Untereinheit statt (Paxton et al., 1986). Neben der reversiblen Phosphorylierung/Dephosphorylierung spielen für die Regulierung der Aktivität des BCKDH-Komplexes auch die Konzentrationsverhältnisse der Substrate (bzw. Substratanaloga) und Produkte des Enzyms (Williamson et al., 1979; Danner et al., 1982) sowie eine Regulierung der Genexpression (Chuang et al., 1983; Chicco et al., 1994) eine Rolle.

1.2.2 Der Stoffwechsel der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA)

Bei der Verstoffwechselung der BCAA, die aus den Nahrungs- und Gewebeproteinen stammen, werden diese durch reversible Transaminierung durch die BCAA-Aminotransferase in die entsprechenden α -Ketosäuren überführt.

Dabei entstehen aus Leucin α -Ketoisocapronsäure (KIC), aus Isoleucin α -Keto- β -Methylvaleriansäure (KMV) und aus Valin α -Ketoisovaleriansäure (KIV).

Der weitere Abbau der α -Ketosäuren (RCO-COOH) erfolgt durch irreversible Dekarboxylierung vermittelt durch den BCKDH-Enzymkomplex. Die Dekarboxylierungsreaktion der α -Ketosäuren durch die BCKDH verläuft nach der folgenden Formel:



Der Abbau der BCAA ist in **Abbildung 1.2** dargestellt. In dieser Abbildung ist die Blockade des Stoffwechsels bei der MSUD durch einen schwarzen Balken markiert. Es wird ersichtlich, dass sich im Falle der MSUD im Körper primär die BCKA proximal des Stoffwechselblocks anhäufen. Diese werden aber aufgrund der reversiblen Transaminierung durch die BCAA-Aminotransferase in den Geweben in die entsprechenden Aminosäuren überführt. Somit akkumulieren bei der MSUD in den Körperflüssigkeiten sowohl die verschiedenen BCKA als auch die BCAA (Chuang & Shih, 2001).

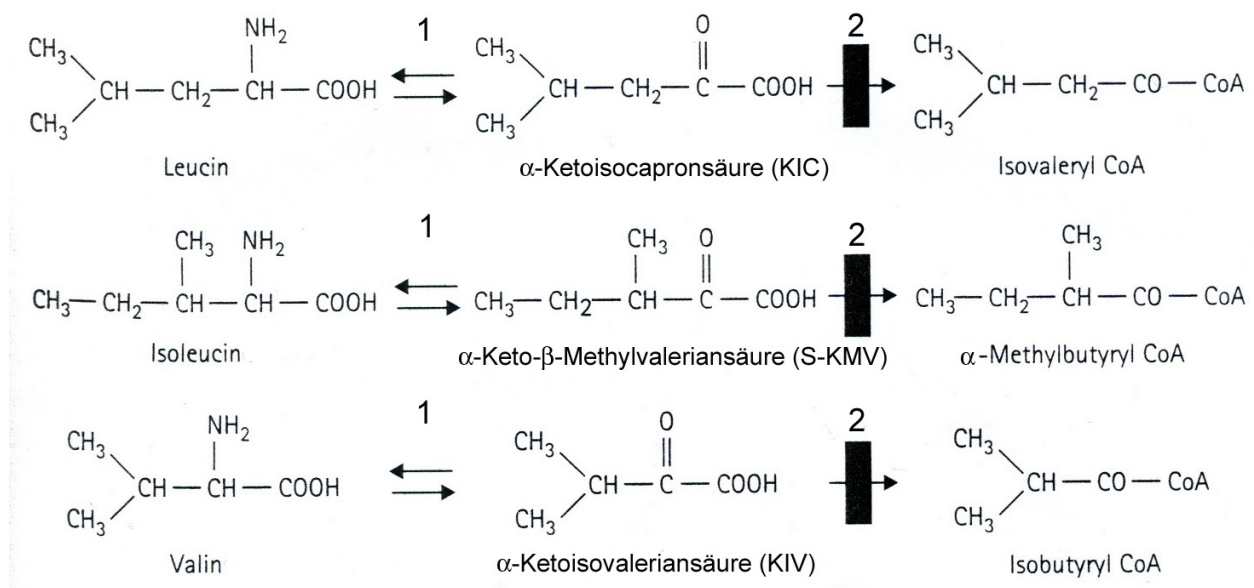


Abbildung 1.2: Der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren (modifiziert aus Nyhan *et al.*, 2005): Enzymschritt 1 wird katalysiert durch die BCAA-Aminotransferase, Enzymschritt 2 durch die BCKDH. Enzymschritt 2 ist bei der MSUD blockiert.

Die Blockade im Isoleucinabbau bedeutet primär eine Akkumulation von S-KMV. Besonders unter den Bedingungen hoher S-KMV-Konzentrationen kommt es zu einer Umlagerung dieser α-Ketosäure durch Keto-Enol-Tautomerisierung zu R-KMV. Durch reversible Transaminierung von R-KMV entsteht die Aminosäure L-Allo-Isoleucin. Allo-Isoleucin ist ein Stereoisomer von Isoleucin und kann, da es nicht proteinogen ist und somit in keinem Protein enthalten ist, lediglich aus R-KMV entstehen. Allo-Isoleucin ist bei gesunden Individuen nur in äußerst geringer Konzentration im Plasma nachweisbar (< 5 µmol/l). In größeren Mengen entsteht es im Rahmen einer Aktivitätseinschränkung der BCKDH bei der MSUD und es ist in erhöhter Konzentration als pathognomonisch für die MSUD zu betrachten. Die Erhöhung von Allo-Isoleucin in Relation zum Ausmaß einer vorliegenden BCKDH-Aktivitätsminderung macht diese Aminosäure als diagnostischen Parameter für die Abschätzung des Schweregrades einer MSUD interessant (Schadewaldt *et al.*, 1999).

1.2.3 Auswirkungen der Akkumulation der verzweigtkettigen Aminosäuren und Metabolite – Pathomechanismus

Die akkumulierenden BCAA und BCKA haben sowohl eine akute als auch eine chronische neurotoxische Wirkung auf das Gehirn. Die neurotoxische Wirkung geht dabei hauptsächlich von Leucin und der zugehörigen Ketosäure KIC aus. Der Mechanismus der Neurotoxizität ist noch nicht vollständig bekannt. Wahrscheinlich spielen zwei sich unterstützende Mechanismen eine Rolle.

1. Ein Mangel an essentiellen Aminosäuren im Gehirn durch einen unausgewogenen Transport der neutralen Aminosäuren (Phenylalanin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin etc.) durch die Bluthirnschranke führt zu einer eingeschränkten Protein- und Neurotransmittersynthese im Gehirn. Diese Störungen sind mit der Akkumulation von Leucin assoziiert.
2. Es kommt zu einer Störung des Glutamatstoffwechsels in den Astrozyten und Synaptosomen sowie zu einem Energiemangel in den Zellen infolge einer Beeinträchtigung des Citratzyklus. Diese Störungen sind in erster Linie mit der Akkumulation der KIC assoziiert (*Zinnanti et al., 2009*).

Abbildung 1.3 zeigt einen Überblick über die vermuteten Pathomechanismen:

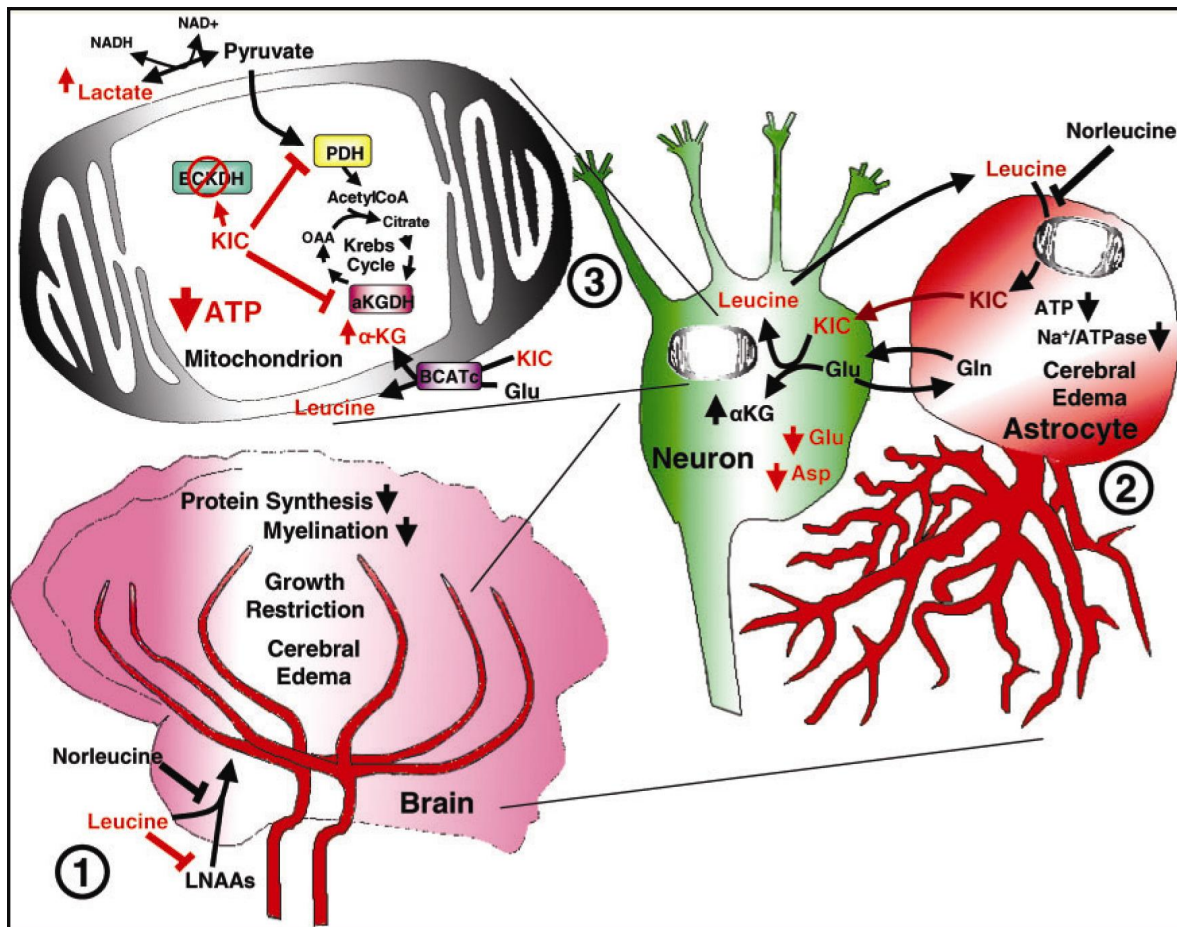


Abbildung 1.3: Vermutete Pathomechanismen der MSUD (modifiziert aus Zinnanti et al., 2009): (1): Das akkumulierende Leucin konkurriert mit neutralen Aminosäuren (large neutral amino acids, LNAAs) am LAT1-Transporter der Bluthirnschranke. Die dadurch entstehenden verminderten Konzentrationen der Aminosäuren innerhalb der Bluthirnschranke führen zu einer verminderten Neurotransmitter- und Proteinsynthese und zur Dysmyelinisierung. (2): Die Akkumulation von KIC in den Astrozyten und Neuronen führt durch Transaminierung zu Leucin zu einem relativen Mangel an Aminogruppen und dadurch zu einer Erhöhung des α -Ketoglutarat (α -KG)/Glutamat-Konzentrationsverhältnisses. (3): Ein Anstieg des α -KG/Glutamat-Verhältnisses führt in den Mitochondrien zu einer Beeinträchtigung des Malat/Aspartat-Shuttles und damit zu einem erhöhten NADH/NAD⁺-Verhältnis, was den Abbau von Laktat zu Pyruvat hemmt. Außerdem kommt es in den Mitochondrien durch die hohe KIC-Konzentration über eine Hemmung der PDH und der α -KGDH zu einer Störung des Citratzyklus (=Krebszyklus) und damit verbunden zu einer verminderten ATP-Synthese. Dadurch wird wiederum die Na⁺/K⁺-Ionenpumpe in ihrer Funktion beeinträchtigt, was zu einer Schwellung der Astrozyten und zu einem Hirnödem führen kann (siehe 2).

Ein akuter starker Anstieg der Leucin- und KIC-Konzentrationen, z. B. im Rahmen eines Katabolismus von körpereigenem Protein während interkurrenter Erkrankungen

(kataboler Stress), führt zu einer akuten Encephalopathie begleitet von einem Hirnödem. Bei langfristig mäßiggradig erhöhten Leucin- und KIC-Konzentrationen kommt es dahingegen zu einer chronischen Hirnschädigung mit Dysmyelinisierung (*Silberman et al., 1961; Schönberger et al., 2004*).

Aus diesen Zusammenhängen folgt, dass zur Vermeidung einer Hirnschädigung Patienten mit MSUD eine lebenslange Behandlung benötigen, durch welche die Plasmakonzentrationen für Leucin und die anderen BCAA in den normnahen Bereich gesenkt werden.

1.3 *Klinische Phänotypen der MSUD*

Die MSUD präsentiert sich in verschiedenen Formen, die sich hinsichtlich des klinischen Verlaufs, der Art und Ausprägung der Symptomatik und der erforderlichen Therapie sowie einiger biochemischer Parameter unterscheiden.

Derzeit werden eine klassische Form und mehrere variante Formen unterschieden (*Chuang & Shih, 2001; Simon et al., 2006a*).

1.3.1 *Klassische MSUD*

Die klassische Form der MSUD stellt die schwerste und mit einem Anteil von 75 % aller Fälle zugleich die häufigste Verlaufsform dar.

Bei Geburt verhalten sich die Kinder zunächst noch unauffällig, da die intrauterin akkumulierten verzweigkettigen Substanzen über die Plazenta eliminiert wurden. Aufgrund eines kritischen Anstiegs der BCAA und BCKA in Blut und Geweben durch postnatalen Abbau von Gewebs- und Nahrungsproteinen wird das betroffene Neugeborene ab dem vierten bis siebten Lebenstag lethargisch. Es zeigt eine Trinkschwäche und entwickelt eine progrediente neurologische Symptomatik (*Mackenzie & Woolf, 1959; Dancis et al., 1960; Matsuda et al., 1990*).

Im Sinne einer metabolischen Encephalopathie entwickeln die Patienten eine Symptomatik mit Hypo- und Areflexie, Rumpfhypotonie bei gleichzeitiger Hypertonie der Extremitätenmuskulatur und Ausbildung eines Hirnödems, das sich als Vorwölbung der Fontanelle zeigt, aber auch durch CT- oder MRT-Bildgebung dargestellt werden kann

(Mantovani et al., 1980; Mikati et al., 1982; Suzuki et al., 1983; Romero et al., 1984; Morton et al., 2002). Es kann zu cerebralen Krampfanfällen kommen und ein charakteristisches EEG-Muster mit einem kammartigen Rhythmus wurde beschrieben (Estivill et al., 1985; Korein et al., 1994). Bei progredientem Krankheitsverlauf kommt es schließlich zur respiratorischen Insuffizienz, die in einem tiefen Koma endet, das unbehandelt zum Tod führt.

Mit Beginn der neurologischen Symptomatik wird häufig der typische ahornsirupartige Urin- und Körpergeruch wahrnehmbar.

Abhängig von der Dauer der Konzentrationserhöhung und der Höhe der Konzentrationen der neurotoxischen Metabolite sind diese Symptome unter adäquater Therapie mit rascher Senkung der Metabolite reversibel oder gehen in neurologische Defektsyndrome über, die von einer Intelligenzminderung bis hin zur spastischen Zerebralparese reichen können (Snyderman, 1988; Morton et al., 2002; Schönberger et al., 2004; Simon et al., 2007).

Auf die Konstellation der klinisch-chemischen Parameter bei einer klassischen MSUD wird im Kapitel Diagnostik eingegangen.

1.3.2 Variante Formen der MSUD

Die varianten Formen der MSUD verlaufen aufgrund höherer BCKDH-Restaktivitäten meist milder als die klassische MSUD.

Kinder mit einer **intermediären Form**, die als eine schwere Variante gilt, fallen in der Regel in den ersten Lebensjahren durch eine kontinuierlich verzögerte psychomotorische Entwicklung auf. In manchen Fällen wurde auch von neurologischen Symptomen wie einer Ophthalmoplegie berichtet (Zee et al., 1974; Chhabria et al., 1979). Selten kam es zu akuten metabolischen Dekompensationen mit encephalopathischen Episoden. Bei dieser Form der MSUD lagen wahrscheinlich unbemerkt langfristig unkontrolliert hohe BCAA- und BCKA-Spiegel vor.

Die an der leichteren **intermittierenden Form** erkrankten Kinder sind zunächst vollkommen unauffällig ohne Ausbildung von körperlichen, geistigen oder neurologischen Defiziten. Wenn sie jedoch außergewöhnlichen Stoffwechselbelastungen wie beispielsweise bei fieberhaften Infektionskrankheiten, Impfungen, Operationen oder einer übermäßigen Proteinzufuhr ausgesetzt sind,

können die in der Regel nur leicht erhöhten Spiegel der verzweigtkettigen Substanzen in neurotoxische Bereiche ansteigen. Während solcher akuten metabolischen Krisen entwickeln die Patienten neurologische Symptome wie Ataxie, Somnolenz und Koma sowie eine Ketoazidose (*Morris et al., 1961*) und können ohne Therapie versterben. Oft wurde und wird in solchen Fällen die richtige Diagnose einer MSUD erst nach mehreren encephalopathischen Episoden gestellt. In der Regel entwickeln sich die Kinder ohne schwer verlaufende Episoden altersentsprechend (*Chuang & Shih, 2001*).

Von dem Vorkommen einer sehr milden, wahrscheinlich **asymptomatisch verlaufenden Form** der MSUD wurde erst nach Aufnahme der MSUD als Zielkrankheit in das Programm des Neugeborenen Screenings (NBS) berichtet. Bei den entsprechenden Kindern ergab sich zwar ein für eine MSUD auffälliger Befund im Neugeborenen Screening, sie blieben aber zumindest bis ins junge Erwachsenenalter auch während interkurrenter Erkrankungen frei von encephalopathischen Episoden und frei von psychomotorischen oder neurologischen Defiziten (*Ensenauer et al., 2004; Simon et al., 2006a*).

Auf die Konstellation der klinisch-chemischen Parameter bei den varianten Formen der MSUD wird im Kapitel Diagnostik eingegangen.

Tabelle 1.1 zeigt einen Überblick über die klinischen Phänotypen der MSUD.

Tabelle 1.1: Übersicht über die klinischen Phänotypen (modifiziert aus *Gorzelany, 2009*)

Klinischer Phänotyp	Manifestationsalter	Symptomatik/ klinischer Verlauf	Biochemische Parameter	Restaktivität BCKDH (% der Norm)
Klassisch	Neonatal (4. - 7. Lebensstag)	Trinkschwäche, Lethargie, Muskelhypo-/hypertonie, Ketoazidose, zerebrale Krampfanfälle	Stark erhöhte BCAA und BCKA	0 - 2
Intermediär (schwere Variante)	0,5 - 2 Jahre	Psychomotorische Entwicklungsverzögerung, selten akute encephalopathische Episoden, bleibende neurologische Defizite	Permanent erhöhte BCAA und BCKA	3 - 30
Intermittierend (leichte Variante)	0,5 - 7 Jahre	Episodisch Ataxie/ Ketoazidose während Infektionen (kataboler Stress); normale Entwicklung	Während asymptomatischer Phasen keine oder nur geringe BCAA-/BCKA-Erhöhungen	5 - 20
Asymptomatisch	-	-	Identifizierung im NBS	13 - 20

Grundsätzlich kann es bei allen klinischen Phänotypen der MSUD im Rahmen eines Gewebskatabolismus mit Abbau von Muskelprotein zu einem starken Anstieg der Plasmakonzentrationen von Leucin und KIC kommen, und dadurch ausgelöst zu einer akuten Encephalopathie, begleitet von einem Hirnödem. Zu solchen metabolischen Entgleisungen kann es selbst bei sorgfältig im Rahmen der Therapie kontrollierten Patienten während interkurrenter Erkrankungen, Hungerzuständen und Operationen kommen (*Morton et al., 2002*).

1.4 Diagnostik

Die Diagnostik der MSUD erfolgte bis zum Jahre 2002 in der Regel aufgrund klinischer Symptome. Seit 2002 (und in Deutschland flächendeckend seit 2005) wird die MSUD, unabhängig von der klinischen Symptomatik, im Rahmen des erweiterten Neugeborenen Screenings (NBS) erkannt.

1.4.1 Erkennung der MSUD im Neugeborenen Screening

Ziel ist die Früherkennung der MSUD bei Neugeborenen durch Untersuchung von Kapillarblut, welches in der 36.-72. Lebensstunde abgenommen und auf eine Filterpapierkarte getropft wird und am Abnahmetag in ein anerkanntes Screeninglabor versandt wird. Dort wird es mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Dabei werden auf der Suche nach einer MSUD im Trockenblut die Summe der Konzentrationen von Leucin und Isoleucin (Leucin + Isoleucin) und die Konzentration von Valin gemessen. Ein positiver auf MSUD verdächtiger Befund liegt vor, wenn die Konzentration für Leucin + Isoleucin oberhalb eines definierten cut-off-Wertes liegt. Ein entsprechender Befund wird umgehend an den Einsender gemeldet mit der Auflage, eine Kontrolluntersuchung oder eine Bestätigungsuntersuchung für MSUD durchzuführen (*Zytkovicz et al., 2001; Schulze et al. 2003; Gemeinsamer Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen, 2005; Simon et al., 2006b*).

Wie für andere Zielkrankheiten des Neugeborenen Screenings gilt auch für die MSUD, dass ein positiver Screeningbefund immer nur eine Verdachtsdiagnose und keine definitive Diagnose darstellt. Es muss stets eine sichere Bestätigung der Diagnose (oder auch ein sicherer Ausschluss der Diagnose) mit geeigneten Anschlussuntersuchungen erfolgen. Zudem ist der üblicherweise angewendete Screeningtest auf MSUD relativ unspezifisch. In einigen Laboratorien konnte die Spezifität dadurch erhöht werden, dass im Trockenblut auch der für MSUD pathognomonische Metabolit Allo-Isoleucin gemessen wird (*Matern et al., 2007; Oglesbee et al., 2008*).

Die frühzeitige Erkennung der MSUD am 4. bis 5. Lebenstag aufgrund erhöhter Konzentrationen der BCAA im Blut bringt es mit sich, dass das betroffene Neugeborene sich noch im präsymptomatischen Stadium oder zu Beginn des symptomatischen Stadiums befindet. Mit dem Neugeborenen Screening können grundsätzlich

Neugeborene sowohl mit der klassischen MSUD als auch mit einer MSUD-Variante erkannt werden und eine Behandlung kann frühzeitig erfolgen, noch bevor es zur Ausbildung schwerer und zum Teil irreversibler Störungen des Zentralnervensystems kommt (*Heldt et al., 2005; Simon et al., 2006b*). Allerdings kann anhand des ersten positiven Screeningbefundes nicht in jedem Falle zwischen einer klassischen MSUD und einer leichteren MSUD-Variante unterschieden werden (*Fingerhut et al., 2008*). In wenigen Fällen sind auch falsch negative Screeningbefunde berichtet worden, für die sich aufgrund später aufgetretener Symptome herausstellte, dass eine MSUD-Variante vorlag (*Bhattacharya et al., 2006*).

Obwohl die eindeutige Forderung besteht, dass eine durch einen positiven Screeningbefund gestellte Verdachtsdiagnose einer MSUD immer eine Bestätigungsdiagnostik mit geeigneten Anschlussuntersuchungen erforderlich macht, ist in Deutschland der Algorithmus, nach dem die Bestätigungsdiagnostik zu erfolgen hat, bisher nicht verbindlich in einer Leitlinie festgelegt.

1.4.2 Bestätigungsdiagnostik der MSUD

Eine sichere Diagnosestellung der MSUD kann ausschließlich durch Anwendung geeigneter Labormethoden erfolgen. Die Labormethoden der Bestätigungsdiagnostik betreffen grundsätzlich Untersuchungen auf drei Ebenen mit von der ersten zur dritten Ebene zunehmender Beweiskraft. Es sind die folgenden:

1. **Die Ebene der Stoffwechselmetabolite:** Auf dieser Ebene erfolgt die Diagnostik über den Nachweis eines für die MSUD spezifischen Metabolitenspektrums im Blutplasma.
2. **Die Ebene der Enzymaktivität:** Auf dieser Ebene erfolgt der biochemische Nachweis einer veränderten Enzymaktivität in unterschiedlichem Zell- oder Gewebematerial.
3. **Die molekulargenetische Ebene:** Auf dieser Ebene erfolgt der molekulargenetische Nachweis krankheitsverursachender Mutationen in den krankheitsspezifischen Genen.

Ad 1.: Die Untersuchung des spezifischen Metabolitenspektrums im Blutplasma und anderen Körperflüssigkeiten ist die erste Ebene der Bestätigungsdiagnostik bei der Verdachtsdiagnose MSUD, gestellt entweder aufgrund der klinischen Symptomatik oder aufgrund eines positiven Befundes im Neugeborenenenscreening.

Bei der Diagnostik der MSUD auf der Ebene der Stoffwechselmetabolite wird in der Regel die Messung der BCAA einschließlich der für die MSUD pathognomonischen Aminosäure Allo-Isoleucin im Plasma mit sensitiven Methoden angewendet. Seltener wird der Nachweis über stark erhöhte Konzentrationen der BCKA im Urin geführt.

Die Konzentrationen der BCAA können in Abhängigkeit vom Schweregrad der MSUD unterschiedlich hoch sein: Sehr sicher für eine klassische MSUD spricht, wenn die Plasma-Leucinspiegel am Ende der ersten Lebenswoche eines Kindes $>> 1000 \mu\text{mol/l}$ (Referenzbereich $< 153 \mu\text{mol/l}$) liegen. Auch die Konzentrationen für Valin und Isoleucin sind stark erhöht, meist aber nicht so ausgeprägt wie für Leucin (Referenzbereich für Valin $< 260 \mu\text{mol/l}$, für Isoleucin $< 76 \mu\text{mol/l}$). Bei den milderer Varianten der MSUD sind die Plasma-Leucinkonzentration weniger stark erhöht: sie liegen etwa zwischen 500 und 1500 $\mu\text{mol/l}$ (*Chuang & Shih, 2001*).

Bei den intermittierenden oder den asymptomatisch verlaufenden MSUD-Varianten sind die Plasma-Leucinspiegel meistens nur leicht erhöht (ca. 350 $\mu\text{mol/l}$); sie können sogar vollständig im Referenzbereich liegen, solange kein kataboler Stress vorliegt. Während eines katabolen Stress begleitet von den Symptomen einer Encephalopathie sind bei Patienten mit einer intermittierenden Variante ebenfalls Plasma-Leucinspiegel von deutlich über 1000 $\mu\text{mol/l}$ zu erwarten. In diesen Fällen sind auch Valin und Isoleucin stark gegenüber der Norm erhöht.

Bei der Bewertung der Allo-Isoleucinspiegel im Plasma sind Werte $> 5 \mu\text{mol/l}$ als pathognomonisch für eine MSUD zu betrachten (*Schadewaldt et al., 1999*). Bei der klassischen MSUD sind am Ende der ersten Lebenswoche eines Kindes Allo-Isoleucinkonzentrationen $> 150 \mu\text{mol/l}$ zu erwarten. Bei milderer Varianten liegen die Spiegel während Zeiten eines relativ geringen Isoleucinspiegels entsprechend niedriger. Allo-Isoleucin eignet sich insbesondere zur differentialdiagnostischen Abgrenzung einer „Stoffwechselkrise mit Encephalopathie“ bei einer intermittierenden MSUD-Variante von durch einen katabolen Stress ausgelösten ketoacidotischen Zuständen bei Personen ohne MSUD. In den letztgenannten Fällen können die BCAA-Spiegel auch ohne das

Vorliegen einer MSUD stark erhöht sein, aber eben ohne Anstieg des Allo-Isoleucin (*Hambraeus et al., 1972; Held et al., 1976*).

Außerdem ist zur Einschätzung des Schweregrades der MSUD das Verhältnis der Konzentrationen von Allo-Isoleucin zu Isoleucin unter stabilen Bedingungen (Allo-Isoleucin/Isoleucin-Ratio) von Interesse, auf das später eingegangen wird.

Ad 2.: Die BCKDH-Aktivitäten und Restaktivitäten werden in Lymphozyten oder kultivierten Fibroblasten gemessen. In der Regel wird die BCKA-Oxidation in kultivierten Fibroblasten (unter Mitführung von Kontrollzelllinien im Test) mit einer radiochemischen Methode durch Messung der Dekarboxylierung von 1-¹⁴C-Leucin gemessen (*Wendel et al., 1981; Schadewaldt et al., 1989*). Die Restaktivität der BCKDH ist mit dem Schweregrad der MSUD korreliert (*Dancis et al., 1972*). Sie beträgt bei der klassischen MSUD weniger als 2-5 % der Aktivität mitgeführter „normaler Zellen“ (*Dancis et al., 1972*). Für die varianten Formen der MSUD werden Restaktivitäten zwischen 3 und 30 % der Norm angegeben, siehe hierzu auch **Tabelle 1.1** (*Chuang & Shih, 2001; Ensenauer et al., 2004; Simon et al., 2006a*).

Ad 3.: In der Literatur sind für die verschiedenen Formen der MSUD derzeit mehr als 166 krankheitsverursachende Mutationen beschrieben (*Chuang et al., 2008*). Bisher wurden krankheitsverursachende Mutationen nur in den drei Genen, dem *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gen berichtet. Alle MSUD-Patienten mit Mutationsnachweis zeichnen sich entweder durch eine Homozygotie der gefundenen Mutation oder eine Compound-Heterozygotie für mutierte Allele an jeweils einem Genlocus aus. Die hohe Zahl an Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlich mutierten Allele kann zur Erklärung der hohen Variabilität des klinischen Phänotyps der MSUD beitragen.

1.5 Therapie

Die Therapie der MSUD besteht einerseits aus einer lebenslang durchzuführenden proteinrestriktiven und somit BCAA-armen Diätbehandlung, insbesondere bei der klassischen MSUD, und andererseits aus der Akutversorgung während kataboler Krisen.

Ziel der Langzeittherapie ist es, die Plasmakonzentrationen der BCAA und ihrer Metaboliten möglichst in den Referenzbereich abzusenken und permanent dort zu halten. Währenddessen muss in Abhängigkeit von Alter, Wachstumsrate und persönlicher Toleranz eine genau zu ermittelnde Menge der drei verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin in ausreichender Höhe in Form von natürlichem Protein aufgenommen werden. Dies ist wichtig um eine altersgerechte Entwicklung des Kindes zu gewährleisten (*Chuang & Shih, 2001; Morton et al., 2002*). Zusätzlich zu dieser sehr proteinarmen Ernährung müssen zum Ausgleich der in unzureichenden Mengen enthaltenen essentiellen nicht-verzweigtkettigen Aminosäuren spezielle Leucin-, Valin- und Isoleucin-freie Aminosäurengemische, angereichert mit Mineralien, Vitaminen und Spurenelementen, substituiert werden.

Die rasche Beseitigung stark erhöhter BCAA- und Metabolitenspiegel während eines katabolen Stresses (z. B. während fieberhafter Infektionskrankheiten) sowie die Abschwächung der katabolen Stoffwechsellage sind die Ziele der Akutversorgung. Während solcher Situationen ist im Allgemeinen temporär eine weitere Reduktion der BCAA-Zufuhr in Form von natürlichem Protein erforderlich. Sollte dadurch der durch Katabolismus ausgelöste BCAA-Anstieg nicht zu beherrschen sein, sind eingreifende Akutmaßnahmen wie Hämofiltration oder Hämodialyse zur raschen Senkung hoher BCAA- und BCKA-Spiegel erforderlich (*Jouvet et al., 1997*). Unterstützend kann durch Anwendung von Insulin und Glukose der katabolen Stoffwechsellage entgegen gewirkt werden (*Wendel et al., 1982*).

Die Therapie der varianten Verlaufsformen der MSUD wird dem individuellen Schweregrad der Erkrankung angepasst. Sie kann von einer wie oben beschriebenen Diät bis hin zu einer moderaten Proteinreduktion im Rahmen einer normalen Ernährung mit Vermeidung von Proteinexzessen reichen.

Es wurden wenige Fälle von Patienten mit klassischer MSUD berichtet, bei denen eine Lebertransplantation durchgeführt wurde und die danach nur noch eine sehr milde MSUD-Variante aufwiesen (*Kaplan et al., 1997; Strauss et al., 2006*). Eine im Proteingehalt eingeschränkte Diät war nach Lebertransplantation nicht mehr erforderlich (*Strauss et al., 2006*).

1.6 Zielsetzung

Mit dem Material von insgesamt 14 Personen, bei denen sich die Verdachtsdiagnose einer MSUD aufgrund der klinischen Symptomatik oder aufgrund eines positiven Befundes im Neugeborenenenscreening ergab, sollte die Bedeutung des Nachweises krankheitsverursachender Mutationen für eine sichere Bestätigung der Diagnose MSUD untersucht werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden folgende Teilaspekte bearbeitet:

- Zuordnung der im Neugeborenenenscreening identifizierten Fälle von MSUD zu einem von drei klinischen Phänotypen im Vergleich zu klinisch diagnostizierten Fällen.
- Molekulargenetische Charakterisierung hinsichtlich möglicher Mutationsereignisse im *BCKDHA*- *BCKDHB*- und *DBT*-Gen bei allen 14 untersuchten Personen.
- Mögliche Konsequenzen der gefundenen Mutationen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der E1- (E1 α - und E1 β -) und E2-Untereinheiten des BCKDH-Multienzymkomplexes.
- Diskussion eines Algorithmus für die Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf eine MSUD aus dem Neugeborenenenscreening.

II. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Es wurden 14 Patienten mit Ahornsirupkrankheit unterschiedlichen Schweregrades und mit unterschiedlicher ethnischer Herkunft untersucht. Sie wurden in verschiedenen pädiatrisch-metabolischen Zentren in Deutschland betreut. Acht Kinder wurden im Neugeborenencreening (NBS) erkannt, sechs Patienten aufgrund klinischer Symptome. Die Patienten, die aufgrund des klinischen Verlaufs diagnostiziert wurden, wurden im Auftrag der sie behandelnden Ärzte in die Untersuchungen für diese Arbeit aufgenommen. Die Kinder, bei denen die MSUD im Rahmen des Neugeborenencreenings diagnostiziert wurde, wurden auf regelmäßiges Abfragen in den Deutschen Screeninglaboratorien und Pädiatrischen Stoffwechselzentren hin mitgeteilt. Es sind die Kinder, bei denen in den Jahren 2005 und 2006 ein positiver Screeningbefund auf MSUD gemeldet wurde. Die Untersuchung des Patienten M.U. mit positivem Screeningbefund aus dem Jahre 2003 erfolgte im Auftrag der behandelnden Ärzte.

Bei jedem Patienten erfolgte die phänotypische Zuordnung anhand der von den behandelnden Ärzten bereitgestellten Daten. Neben dem klinischen Verlauf wurden verschiedene klinisch-chemische Parameter herangezogen: in jedem Falle die Plasmaspiegel der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Valin und Isoleucin, und soweit verfügbar, die von Allo-Isoleucin zum Diagnosezeitpunkt und im Verlauf. Die verwendeten Methoden zur Messung der Plasmaamino-säuren unterschieden sich zwischen den Behandlungszentren (Säulenchromatographie, HPLC, Tandem-Massenspektroskopie). Bei einem Teil der Patienten wurde die Restaktivität der verzweigtkettigen α -Ketosauren-Dehydrogenase (BCKDH) in Fibroblasten gemessen. Die Messungen erfolgten im Stoffwechsellabor der Universitäts-Kinderklinik Düsseldorf in kultivierten Fibroblasten mit 1-¹⁴C-markiertem Leucin als Substrat nach der Methode von Schadewaldt et al. (*Schadewaldt et al.*, 1989). Die Daten wurden aus den Befundberichten entnommen.

Bei allen Patienten wurde die molekulargenetische Charakterisierung hinsichtlich möglicher Mutationseignisse im *BCKDHA*- *BCKDHB*- und *DBT*-Gen durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität genehmigt.

2.2 Vorgehen bei der phänotypischen Zuordnung der Patienten

Anhand der klinischen und klinisch-chemischen Befunde wurde eine Zuordnung der für die molekulargenetische Untersuchung vorgesehenen Personen zu einem von drei Schweregraden von MSUD vorgenommen:

- Klassische MSUD
- Intermediäre oder intermittierende MSUD-Variante
- Noch asymptomatische MSUD-Variante

Zur phänotypischen Zuordnung wurden die folgenden klinisch-chemischen Daten herangezogen:

1. *Höhe der Plasmakonzentrationen der BCAA zum Zeitpunkt der Konfirmationsdiagnostik.*

Als Referenzwerte wurden die von Lepage et al. publizierten Konzentrationen herangezogen. Diese liegen wie folgt: Leu 77-153 $\mu\text{mol/l}$, Val 135-260 $\mu\text{mol/l}$, Ile 39-76 $\mu\text{mol/l}$ (Lepage et al., 1997).

2. *Ausmaß des Anstiegs der Plasmakonzentrationen der BCAA unter Stoffwechselstress im Rahmen fieberhafter interkurrenter Erkrankungen.*

3. *Höhe der Plasmakonzentration von Allo-Isoleucin zum Zeitpunkt der Konfirmationsdiagnostik.*

Für Allo-Isoleucin wurden die Referenzwerte von Schadewaldt et al. herangezogen. Diese betragen $1,6 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$ (Schadewaldt et al., 1999).

4. *Allo-Isoleucin/Isoleucin-Ratio im Verlauf unter stabilen Stoffwechselbedingungen.*

Diese Größe ist ein indirekter Marker für die Restaktivität der BCKDH und somit ein relevanter Parameter zur Einschätzung des Schweregrades der MSUD (Schadewaldt et al., 1989; Wendel et al., 1989). Je höher die Restaktivität der BCKDH ist, desto niedriger ist der Spiegel von Allo-Isoleucin im Vergleich zu Isoleucin unter stabilen Stoffwechsel- und Behandlungsbedingungen und damit auch der Wert für die Allo-

Isoleucin/Isoleucin-Ratio. Bei Patienten mit einer schweren klassischen Form der Ahornsirupkrankheit liegt die Ratio zwischen 0,6 und 0,7 und darüber. Bei den MSUD-Varianten (intermediäre Form, intermittierende Form) liegt sie deutlich unter 0,6 und mit abnehmendem Schweregrad bei Werten bis unter 0,1.

5. Restaktivität der *BCKDH* in Fibroblasten, gemessen als Leucinoxidation.

2.3 *Material*

Die jeweils spezifischen Materialien werden bei den einzelnen Methoden gesondert aufgeführt. Sämtliche weiteren Chemikalien wurden in höchstmöglichem Reinheitsgrad von den Firmen Merck (Darmstadt) und Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen.

Die verwendeten Geräte sind in **Tabelle 2.1** aufgelistet.

Tabelle 2.1: Auflistung der verwendeten Geräte

Verwendung	Gerät, Hersteller
Zentrifugation	Biofuge fresco, Heraeus (Hanau)
Konzentrationsbestimmung	Beckmann Spectrophometer DU-600
	Präzisionsküvetten, Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim)
	Quarzglas Suprasil, Heraeus (Hanau)
Gelelektrophorese	OWI-Separations System, Biorad (München)

2.4 *Methoden*

Die molekulargenetische Charakterisierung umfasst die direkte DNA-Sequenzierung aller Exons und angrenzender Intronsequenzen der *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gene.

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Material: EDTA-Blut
QIAamp® DNA Mini Kit, Qiagen (Hilden)

Es wurden 20 µl Proteinase K mit 200 µl EDTA-Vollblut und 200 µl AL-Puffer vermischt und für 10 Minuten bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol zugeführt und der gesamte Ansatz bei 8.000 Umdrehungen pro Minute über die QIAquick-Säulen zentrifugiert. In mehreren Waschschritten wurde eine Aufreinigung der fest an die Säulenmembran gebundenen DNA erreicht. Die anschließende Elution der DNA aus der Säulenmembran erfolgte durch Zentrifugation nach Zugabe von 200 µl nukleasefreiem Wasser.

Mittels Absorptionsspektrometrie wurde anschließend bei 260 nm Wellenlänge die Konzentration der DNA gemessen. Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm Wellenlänge gemessen und ein Quotient aus den beiden Werten gebildet, um eine mögliche Verunreinigung durch Proteine festzustellen. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2,0 spricht hierbei für reine DNA.

2.4.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte wurde mit zwei verschiedenen Systemen durchgeführt:

System 1

Material: DyNzyme™ DNA-Polymerase Kit, FINNZYMES (Espoo)
Taq-Polymerase™, Qiagen (Hilden)
Oligonukleotide, Firma MWG-Biotech (Ebersberg)
Nuclease-Free Water, Promega Corporation (Mannheim)

System 2

Material: REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen)
Oligonukleotide, Firma MWG-Biotech (Ebersberg)
Nuclease-Free Water, Promega Corporation (Mannheim)

Die verwendeten Primer-Paare für die Amplifikation von DNA-Fragmenten in einer Länge von 133 bis 353 bp, die für die insgesamt 30 Exons der *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gene verwendet wurden, sind in ihren Nukleotidsequenzen in den **Tabellen 7.1 bis 7.3** im Anhang aufgelistet.

Die Reaktionsansätze für die beiden Systeme sind die folgenden:

System 1

Es wurden 28,5 µl nukleasefreies Wasser mit 4 µl Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂), 2 µl DNA (50 ng/µl), 1,5 µl dNTPs, 1 µl Taq-Polymerase und jeweils 1,5 µl Primer (10 pmol/µl) pro Strangseite der DNA gemischt. Das Gesamtvolumen betrug 40 µl pro Ansatz.

System 2

Es wurden 15 µl nukleasefreies Wasser mit 20 µl REDTaq ReadyMix (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0,002 % Gelatine, 0,4 mM dNTPs, Stabilisatoren, 0,06 unit/µl Taq-Polymerase), 2 µl DNA (50 ng/µl) und jeweils 1,5 µl Primer (10 pmol/µl) pro Strangseite der DNA gemischt. Auch hier betrug das Gesamtvolumen pro Ansatz 40 µl.

Zusätzlich wurde für jedes Exon zur Überprüfung auf Kontamination durch Fremd-DNA eine Blindprobe angelegt, die anstelle von DNA nukleasefreies Wasser enthält.

Alle Ansätze wurden in einem Thermoblock (Thermocycler T3 der Firma Biometra, Göttingen) wie folgt inkubiert:

Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer	Prozess
1	96	5 Minuten	Denaturierung
30	94	45 Sekunden	Denaturierung
	X	1 Minute	Hybridisierung
	72	45 Sekunden	Elongation
1	72	3 Minuten	Elongation
	4	∞	Kühlung

Tabelle 2.2: PCR-Reaktionsschritte

Der Heizdeckel hatte eine Temperatur von 95 °C. In der Tabelle steht die Temperatur X stellvertretend für die Temperatur, bei der es zu einer Anlagerung der Primer an die

komplementären DNA-Sequenzen und damit zur Bildung eines Primer-DNA-Hybrids kommt. Diese Temperatur ist abhängig von der Länge der Primer und der enthaltenen Nukleotide und entspricht in etwa der Schmelztemperatur T_m der Primer abzüglich 4 °C. T_m lässt sich durch folgende Formel berechnen:

$$T_m = 4\text{ °C} \times (\text{Anzahl C} + \text{G}) + 2\text{ °C} \times (\text{Anzahl A} + \text{T})$$

Im Anschluss an die PCR erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente.

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Material: Agarosegel, Bio-Budget Technologies (Krefeld)
100 bp-Leiter, Invitrogen®

Das Gel hatte eine Prozentigkeit von 2 % und wurde in 1x TBE-Puffer (110 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Na-EDTA) verwendet. Die mit System 1 entstandenen PCR-Produkte wurden mit 7 µl Auftragspuffer (30 % Glycerin, 0,25 % Xylencyanol, 0,25 % Bromphenolblau) vermischt und in ausgesparte Taschen auf das Gel aufgetragen. Die mit System 2 entstandenen Proben enthielten bereits einen Auftragspuffer und konnten direkt aufgetragen werden. Als Größenstandard diente die 100 bp-Leiter. Die Elektrophorese wurde bei 180 mA Strom und maximal 120 V Spannung für 90 bis 180 Minuten durchgeführt.

Um die Banden nach beendeter Gelelektrophorese für die Auswertung sichtbar zu machen, wurde das Gel für 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) inkubiert, wodurch Bereiche, in denen sich DNA befindet, im UV-Licht als Banden sichtbar wurden. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit dem Biometra Bio Doc Analyze System der Whatman Biometra GmbH (Göttingen).

Abbildung 2.1 zeigt ein entsprechendes Bandenmuster.

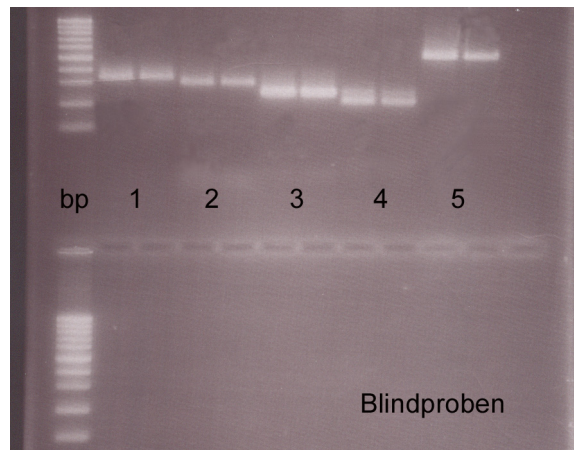


Abb. 2.1.: Agarosegel mit DNA-Banden, bp = 100 bp-Leiter, Nr. 1-5 = PCR-Produkte

2.4.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegel

Material: QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen (Hilden)
Nuclease-Free Water, Promega Corporation (Mannheim)

Die aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnittenen DNA-Fragmente wogen im Durchschnitt 300 mg. Sie wurden mit 900 µl QG-Puffer versetzt und für 15 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach der vollständigen Auflösung der Agarose wurden 300 µl Isopropanol beigemischt und der gesamte Ansatz bei 10.000 Umdrehungen pro Minute über die QIAquick-Säulen zentrifugiert. In mehreren Waschschritten wurde eine Aufreinigung der fest an die Säulenmembran gebundenen DNA erreicht. Die anschließende Elution der DNA aus der Säulenmembran erfolgte durch Zentrifugation nach Zugabe von 30 µl nukleasefreiem Wasser.

2.4.5 Sequenzier-Polymerasekettenreaktion (Cycle Sequencing)

Material: Big Dye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit,
Applied Biosystems (Weiterstadt)

Die Sequenzierung wurde mit der „Dye-Terminator“-Methode durchgeführt. Für jedes Exon der drei Gene wurde je ein Ansatz für die beiden Stränge der DNA angelegt, so dass man eine „Vorwärtsreaktion“ (5'-3') und eine „Rückwärtsreaktion“ (3'-

5') erhielt. Pro Ansatz wurden 13 µl Nuklease-freies Wasser mit 3 µl Sequenzier-Puffer, 2 µl Big Dye Reagenz, 2 µl der isolierten DNA-Fragmente und 1 µl Primer (10 pmol/µl) gemischt.

Die Sequenzier-PCR wurde dann in einem Thermoblock (Thermocycler T3 der Firma Biometra, Göttingen) bei einer Heizdeckeltemperatur von 95 °C mit folgenden Reaktionsschritten durchgeführt:

Anzahl Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer	Prozess
1	96	40 Sekunden	Initiale Denaturierung
25	96	15 Sekunden	Denaturierung
	53	5 Sekunden	Hybridisierung
	60	4 Minuten	Elongation
	4	∞	Kühlung

Tabelle 2.3: Sequenzier-PCR-Reaktionsschritte

2.4.6 Kapillarelektrophoretische Sequenzdetektion

Material: DyeEx Spin Kit, Qiagen (Hilden)
 Formamid, Calbiochem® (Darmstadt)
 POP-6™, Applied Biosystems (Weiterstadt)

Die Produkte der Sequenzier-PCR wurden nach Angaben des Herstellers über DyeEx Spin Säulen zentrifugiert und aufgereinigt. Danach wurden die Proben 1:2 mit 10 µl Formamid verdünnt und zur Sequenzierung in ein automatisches Sequenziergerät (ABI PRISM™ 310 Genetic-Analyzer, Applied Biosystems) gegeben. Die automatische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm Genescan Multianalyst, Version 3.1.2 und die grafische Darstellung unter Verwendung des Programms Sequence Scanner Version 1.0 (beide Applied Biosystems).

2.4.7 Beschreibung der Mutationen

Die DNA-Sequenzen der untersuchten MSUD-Patienten, wurden mit den Referenzsequenzen für genomische DNA und mRNA verglichen. Diese finden sich in

der NCBI GenBank, Zugangsnummern: NM_000709 (*BCKDHA*-Gen, Contig NT_011109), NM_000056 (*BCKDHB*-Gen, Contig NT_007299) und NM_001918 (*DBT*-Gen, Contig NT_028050).

Die Mutationsbeschreibung erfolgt nach den internationalen Konventionen für die Nomenklatur menschlicher Genmutationen (Human Genome Variation Society; <http://www.hgvs.org/mutnomen>). Die Nummerierung der Nukleotide in der cDNA beginnt mit dem Initiationskodon ATG, dessen erster Nukleobase Adenin die Position +1 zukommt.

III. Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Patienten und Bewertung des jeweiligen Schweregrades der MSUD

Im Folgenden werden die klinischen und biochemischen Befunde der untersuchten Personen dargestellt und anschließend wird aufgrund dieser Befunde eine Beurteilung abgegeben, ob und mit welchem Schweregrad eine MSUD vorliegt.

Eine Übersicht über die verwendeten klinischen und klinisch-chemischen Daten geben im Anschluss die **Tabellen 3.1** und **3.2**.

3.1.1 Patienten, bei denen eine MSUD aufgrund des klinischen Verlaufs diagnostiziert wurde

M.S., männlich, geb. 1987, betreut in Berlin

In den ersten Lebenstagen zunehmende Trinkschwäche und Somnolenz. Bis zum Ende der 3. Lebenswoche Auftreten schwerer neurologischer Symptome (ausgeprägte Hypertonie der Extremitäten), tonischer Krampfanfälle, eines Hirnödems (nachgewiesen durch CT) und eines Körpergeruchs nach "Maggi". Im Alter von 21 Tagen Diagnosestellung einer MSUD aufgrund stark erhöhter BCAA-Konzentrationen im Plasma mit folgenden Werten: Leu 1790 µmol/l, Val 837 µmol/l, Ile 820 µmol/l, Allo-Ile nicht bestimmt.

Seit Diagnosestellung Behandlung mit einer strengen, im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät. Der Patient ist im Alter von 19 Jahren in seiner psychointellektuellen Entwicklung stark eingeschränkt und weist eine spastische Tetraparese auf.

Während in der Vergangenheit durchgemachter interkurrenter (fiebrhafter) Erkrankungen kam es mehrmals zu einem deutlichen Anstieg der Plasma-BCAA-Spiegel mit Werten für Leu >1300 µmol/l.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile/Ile-Ratio um 0,6.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: nicht bestimmt.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten liegt eine **klassische MSUD** vor.

J.S., weiblich, geb. 1991, betreut in Heidelberg

Das Mädchen wurde im Alter von 14 Jahren im Rahmen eines fieberhaften Infekts mit rezidivierendem Erbrechen durch eine Enzephalopathie (Bewusstseinstörung, Verwirrheitszustände, verzögerte Reaktion) auffällig. Während des enzephalopathischen Zustandes wurde anhand der folgenden Plasma-Aminosäurespiegel die Diagnose MSUD gestellt: Leu 1408 µmol/l, Val 917 µmol/l, Ile 461 µmol/l und Allo-Ile 125 µmol/l. Unter Infusionstherapie mit Glukose und Elektrolyten kam es zu einer raschen Besserung des Zustands. In der Annahme, dass es sich um eine intermittierende Variante der MSUD handelt, wurde auf eine strenge, im BCAA-Gehalt stark eingeschränkte Diät verzichtet. Es wurde lediglich eine im Proteingehalt kontrollierte Ernährung empfohlen. Unter dieser Ernährung kam es über drei Jahre zu keinem erneuten Anstieg der BCAA und die weitere Entwicklung der Patientin verlief unauffällig. Die Plasma-Leucinspiegel lagen bei wiederholten Kontrollen im Referenzbereich.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile/Ile-Ratio: wegen fehlender Angaben nicht zu ermitteln.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: Die Decarboxylierungsaktivität für verzweigtkettige Ketosäuren (BCKA) ist deutlich gegenüber Kontrollen reduziert. Der Befund weist auf eine partielle Störung der BCKA-Oxidation hin.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und vorliegenden klinisch-chemischen Daten liegt eine **intermittierende Variante** der MSUD vor.

S.W., weiblich, geb. 1992, zuletzt betreut in München

Diagnosestellung einer MSUD während einer bereits weit fortgeschrittenen ketoazidotischen Stoffwechselentgleisung mit Hirnödem während eines fieberhaften Infekts im Alter von 14 Jahren. Die BCAA-Konzentrationen im Plasma, die zur Diagnosestellung führten, waren wie folgt: Leu 1460 $\mu\text{mol/l}$, Val 1320 $\mu\text{mol/l}$, Ile 626 $\mu\text{mol/l}$, Allo-Ile ohne Angaben. Die Patientin verstarb trotz intensivmedizinischer Maßnahmen im Rahmen dieser schweren Stoffwechselentgleisung.

In der Anamnese werden encephalopathische Episoden (Gangunsicherheit, Schwindel, Sprachstörungen) während fieberhafter Infekte im Alter von 3 und 10 Jahren erwähnt. Infolge pathologischer EEG-Befunde wurde eine Epilepsie diagnostiziert und eine antikonvulsive Therapie wurde begonnen.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: Die Dekarboxylierungsaktivität für die verzweigtkettigen Ketosäuren (BCKA) ist deutlich gegenüber Kontrollen reduziert. Der Befund weist auf eine partielle Störung der BCKA-Oxidation hin.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und vorliegenden klinisch-chemischen Daten liegt eine **intermittierende Variante** der MSUD vor.

A.H., männlich, geb. 1993, derzeit betreut in Düsseldorf (zuvor in Frankfurt und Münster)

A.H. ist ein Kind konsanguiner Eltern aus dem Libanon. Die Diagnose MSUD wurde im Rahmen einer neonatalen Stoffwechselkrise mit neurologischen Zeichen, Krampfanfällen und ausgeprägter Somnolenz, bis hin zum Koma, am 11. Lebenstag gestellt. Die Plasma-BCAA-Konzentrationen lagen wie folgt: Leu 2733 $\mu\text{mol/l}$, Val 675 $\mu\text{mol/l}$, Ile 344 $\mu\text{mol/l}$, Allo-Ile ohne Angaben. Akute Senkung der BCAA durch Austauschtransfusionen. Seit Diagnosestellung Einhaltung einer strengen, im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät. Während in der Vergangenheit durchgemachter interkurrenter (fieberhafter) Erkrankungen kam es wiederholt zu einem Anstieg des Plasma-Leucinspiegels auf über 1000 $\mu\text{mol/l}$.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile/Ile-Ratio um 0,7.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: nicht bestimmt.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten liegt eine **klassische MSUD** vor.

L.S., weiblich, geb. 2004, betreut in Berlin

L.S. ist ein Kind konsanguiner Eltern aus dem Libanon. Das erweiterte Neugeborenencreening ergab keinen Hinweis auf MSUD. Mit 7 Monaten erkrankte das Mädchen an einer hochfieberhaften Otitis media. In deren Verlauf kam es zur Ausbildung einer metabolischen Azidose und zu einer Konzentrationserhöhung der Plasmaamino-säuren auf folgende Werte: Leu 607 µmol/l, Val 922 µmol/l und Ile 317 µmol/l, Allo-Ile ohne Angaben. Im Urin wurden verzweigtkettige α-Ketosäuren nachgewiesen.

Bisher hat sich ein entsprechendes azidotisches Krankheitsbild nicht wiederholt. Sämtliche Laborkontrollen waren unauffällig. Die Patientin hat sich ohne eine spezielle Diät altersgemäß entwickelt.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile: Bei wiederholter Bestimmung war die Plasmakonzentration von Allo-Ile nicht erhöht.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: Die Decarboxylierungsaktivität für BCKA lag etwas niedriger als bei den mitgeführten Kontrollzelllinien. Insgesamt ließ sich aber eine Einschränkung der BCKA-Oxidation nicht sicher nachweisen.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten lässt sich **keine eindeutige Aussage** darüber machen, ob das Mädchen an einer MSUD leidet.

N.S., männlich, geb. 2005, betreut in Moskau

Der Patient stammt aus einer deutschstämmigen Familie in Tscheljabinsk. In der Neonatalperiode schwere encephalopathische Symptome. Die Diagnose MSUD wurde im Alter von 4 Monaten anhand der folgenden Plasma-Aminosäurespiegel gestellt: Leu 4376 $\mu\text{mol/l}$, Val 1204 $\mu\text{mol/l}$, Ile 742 $\mu\text{mol/l}$, Allo-Ile 277 $\mu\text{mol/l}$. Zu dem Diagnosezeitpunkt waren die psychomotorische und neurologische Entwicklung deutlich eingeschränkt. Seit Diagnosestellung wird eine zum Teil unzureichende Behandlung mit einer strengen, im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät durchgeführt.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile/Ile-Ratio um 0,7.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: nicht bestimmt.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten liegt eine **klassische MSUD** vor.

3.1.2 Kinder, bei denen die Verdachtsdiagnose einer MSUD im Neugeborenenenscreening gestellt wurde

M.U., weiblich, geb. 2003, betreut in München

Das Mädchen stammt aus einer türkischstämmigen Familie. Es ergab sich ein für eine MSUD auffälliger Befund im Trockenblut vom 3. Lebenstag. Bei der Konfirmationsdiagnostik am 4. Lebenstag wurden folgende BCAA-Konzentrationen im Plasma gemessen: Leu 407 $\mu\text{mol/l}$, Val 470 $\mu\text{mol/l}$, Ile 152 $\mu\text{mol/l}$ und Allo-Ile 31 $\mu\text{mol/l}$. Zu diesem Zeitpunkt zeigte das Neugeborene keine Symptome. Die Plasma-Leucinkonzentration sank unter leucinfreier Ernährung in den Normbereich.

Beginn einer Behandlung mit einer im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät, unter der die Plasma-Leucinkonzentrationen im Referenz- oder referenznahen Bereich lagen. Im Rahmen interkurrenter Erkrankungen stieg die Leucinkonzentration bis auf Werte um 500 $\mu\text{mol/l}$. Bei einem probatorischen Aussetzen der MSUD-Diät für eine Woche kam es zu einem leichten, nicht genau zu definierenden Anstieg der BCAA.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile im Plasma: es wurden Konzentrationen zwischen 21 und 24 $\mu\text{mol/l}$ gemessen.

Allo-Ile/Ile-Ratio um 0,15.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: Es ergab sich kein Hinweis auf das Vorliegen einer Störung der BCKA-Oxidation.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten besteht der Verdacht auf eine **sehr leichte MSUD-Variante**.

J.J., weiblich, geb. 2005, betreut in Heidelberg

Die Familie des Mädchens stammt aus den USA. Im dort durchgeführten Neugeborenen-Screening wurde eine sehr leicht erhöhte Leucin-/Isoleucinkonzentration im Trockenblut (Leucin + Isoleucinkonzentration 237 $\mu\text{mol/l}$; cut-off 232 $\mu\text{mol/l}$) festgestellt. Bei der Konfirmationsdiagnostik am 30. Lebenstag wurden folgende BCAA Konzentrationen im Plasma gemessen: Leu 328 $\mu\text{mol/l}$, Val 333 $\mu\text{mol/l}$, Ile 196 $\mu\text{mol/l}$, Allo-Ile nicht nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt und auch im weiteren Verlauf wies das Mädchen keinerlei Symptome auf. Ohne eine spezifische Behandlung hat sich das Mädchen bisher völlig altersgerecht entwickelt. Bisher kam es während interkurrenter Erkrankungen nicht zu Symptomen und es wurden während Kontrolluntersuchungen Plasma-BCAA-Konzentrationen an der oberen Grenze des Referenzbereichs gemessen.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile wurde bei zweimaliger Untersuchung nicht erhöht gefunden.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: nicht bestimmt.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten ist eine MSUD **nicht gesichert**. Allenfalls handelt es sich um eine äußerst leichte Form der MSUD.

J.M., männlich, geb. 2005, betreut in Berlin

Für eine MSUD auffälliger Befund im Trockenblut vom 4. Lebenstag. Die Konfirmationsdiagnostik erfolgte erst am 23. Lebenstag nach einem zweiten leicht auffälligen Screeningbefund für MSUD. In einer ersten Kontrolluntersuchung am 6. Lebenstag waren die Konzentrationen der BCAA unauffällig, es fanden sich lediglich auffällige Konzentrationsverhältnisse der BCAA zu anderen Aminosäuren. Die Plasmakonzentrationen der BCAA lagen im Alter von 23 Tagen folgendermaßen: Leu 253 µmol/l, Val 268 µmol/l, Ile 131 µmol/l, Allo-Ile 7 µmol/l. Das Neugeborene zeigte keinerlei Symptome.

Der Junge erhält eine im Proteingehalt leicht eingeschränkte Ernährung, erfährt sonst aber keinerlei Behandlung. Die Plasma-Leucinkonzentrationen lagen bei Kontrolluntersuchungen zwischen 118 und 385 µmol/l. Im Rahmen von interkurrenten Erkrankungen kam es bisher nicht zu einem Anstieg der Plasma-Leucinkonzentration auf über 500 µmol/l.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile im Plasma war nur leicht erhöht (maximal 12 µmol/l). Allo-Ile/Ile-Ratio etwa 0,07. Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: Die Decarboxylierungsaktivität für die BCKA lag unterhalb der von Normalkontrollen. Der Befund weist auf eine partielle Störung der BCKA-Oxidation hin.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten besteht der Verdacht auf eine **sehr leichte MSUD-Variante**.

E.H., männlich, geb. 2005, betreut in Heidelberg

Die Eltern sind konsanguin und stammen aus der Türkei. Für eine MSUD auffälliger Befund im Trockenblut vom 3. Lebenstag. Die Konfirmationsdiagnostik erfolgte erst am 16. Lebenstag. Die Plasmakonzentrationen der BCAA lagen zu diesem Zeitpunkt wie folgt: Leu 766 µmol/l, Val 678 µmol/l und Ile 306 µmol/l, Allo-Ile ohne Angaben. Das Neugeborene zeigte keine klinischen Symptome und die Leucinkonzentration sank unter leucinfreier Ernährung rasch in den Referenzbereich ab.

Während einer im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät ergaben sich Hinweise auf eine sehr geringe Leucintoleranz wie bei einer klassischen MSUD. Unter strikter MSUD-Diät lagen die Plasma-Leucinkonzentrationen im Verlauf im Referenz- oder referenznahen Bereich. Im Alter von drei Jahren wurde die Diät von den Eltern beendet mit der Konsequenz, dass die Leucinkonzentrationen in einen Bereich von 400 bis 650 $\mu\text{mol/l}$ anstiegen. Im Rahmen einer schweren fieberhaften Gastroenteritis kam es zu ausgeprägten encephalopatischen Symptomen bei Plasma-Leucinspiegel von über 1300 $\mu\text{mol/l}$.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile wurde im Verlauf nicht bestimmt.

Die Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten wurde nicht bestimmt.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten liegt eine **MSUD-Variante** vor, wobei nicht eindeutig zwischen einer **intermittierenden** und einer **intermediären Form** unterschieden werden kann.

J.H., weiblich, geb. 2005, betreut in Münster

Für eine MSUD auffälliger Befund im Trockenblut vom 3. Lebenstag. Bei der Konfirmationsdiagnostik am 4. Lebenstag wurden folgende BCAA-Konzentrationen im Plasma gemessen: Leu 1675 $\mu\text{mol/l}$, Val 487 $\mu\text{mol/l}$, Ile 292 $\mu\text{mol/l}$, Allo-Ile 159 $\mu\text{mol/l}$. Zu diesem Zeitpunkt zeigte das Mädchen eine leichte neurologische Symptomatik und einen erhöhten Muskeltonus. Am 5. Lebenstag Initialbehandlung mittels Hämodialyse/Hämofiltration zur Senkung der Plasma-Leucinkonzentration.

Beginn einer Behandlung mit einer strengen im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät. Die Leucintoleranz war wie bei klassischer MSUD sehr gering.

Unter der strengen Diät lagen die Plasma-Leucinkonzentrationen im Verlauf im Referenz- oder referenznahen Bereich. Im Rahmen interkurrenter Erkrankungen stieg die Plasma-Leucinkonzentration auf Werte bis zu 1140 $\mu\text{mol/l}$ an. Bisher altersgerechte Entwicklung.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile/Ile Ratio bei 0,65.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: stark gegenüber der Aktivität in mitgeführten Kontrollzelllinien reduziert.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten liegt eine **klassische MSUD** vor.

I.V., weiblich, geb. 2006, betreut in Düsseldorf

I.V. ist ein Kind türkischer konsanguiner Eltern. Für eine MSUD auffälliger Befund im Trockenblut vom 3. Lebenstag. Bei der Konfirmationsdiagnostik am 4. Lebenstag wurden folgende BCAA-Konzentrationen im Plasma gemessen: Leu 1180 µmol/l, Val 670 µmol/l, Ile 339 µmol/l, Allo-Ile 169 µmol/l. Das Neugeborene zeigte zu diesem Zeitpunkt mäßiggradig ausgebildete neurologische Zeichen wie Hyperexzitabilität und Muskelhypertonie. Abfall der Plasma-Leucinkonzentration unter konservativer Behandlung mit einer leucinfreien Nahrung in den Referenzbereich und Beginn mit einer im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät.

Unter der strengen Diät lagen die Leucinwerte im Verlauf im Referenz- oder referenznahen Bereich. Im Rahmen interkurrenter fieberhafter Erkrankungen stiegen die Leucinkonzentrationen auf Werte bis zu 1050 µmol/l an.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile/Ile-Ratio: 0,7 - 0,8.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: nicht bestimmt.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten liegt eine **klassische MSUD** vor.

K.M., männlich, geb. 2006, betreut in Münster

Das Kind stammt aus einer Aussiedlerfamilie aus Russland. Für eine MSUD auffälliger Befund im Trockenblut vom 3. Lebenstag. Bei der Konfirmationsdiagnostik am

4. Lebenstag wurden die folgenden BCAA-Plasmakonzentrationen gemessen: Leu 1800 $\mu\text{mol/l}$, Val 900 $\mu\text{mol/l}$, und Ile 300 $\mu\text{mol/l}$, Allo-Ile: stark erhöht.

Klinische Symptomatik zu diesem Zeitpunkt: Leichte neurologische Zeichen, muskuläre Hypertonie, Maggigeruch.

Initialbehandlung am 5. Lebenstag: Senkung des Leucinspiegels durch Hämodialyse. Beginn einer Behandlung mit einer strengen im BCAA-Gehalt stark eingeschränkten Diät. Die Leucintoleranz war wie bei klassischer MSUD sehr gering.

Unter der strengen Diät lagen die Plasma-Leucinkonzentrationen im Verlauf im Referenz- oder referenznahen Bereich. Im Rahmen einer interkurrenten Erkrankung stieg die Leucinkonzentration auf Werte um 500 $\mu\text{mol/l}$ an. Bisher altersgerechte Entwicklung.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Allo-Ile/Ile-Ratio bei 0,8.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: nicht bestimmt.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten liegt eine **klassische MSUD** vor.

C.D., weiblich, geb. 2006, betreut in Berlin

Für eine MSUD auffälliger Befund im Trockenblut vom 3. Lebenstag. Bei der Konfirmationsdiagnostik am 6. Lebenstag wurden die folgenden Plasma-BCAA-Konzentrationen festgestellt: Leu 421 $\mu\text{mol/l}$, Val 351 $\mu\text{mol/l}$, Ile 165 $\mu\text{mol/l}$, Allo-Ile 21 $\mu\text{mol/l}$. Das Neugeborene zeigte keine Symptome.

Seit Diagnosestellung erhält das Mädchen eine leicht im Proteingehalt eingeschränkte Ernährung mit Substitution einer BCAA-freien Aminosäuremischung. Unter der Diät lagen die Plasma-Leucinkonzentrationen im Referenz- oder referenznahen Bereich. Im Rahmen interkurrenter Erkrankungen stiegen die Leucinkonzentrationen an, einmal bis auf einen Wert von 766 $\mu\text{mol/l}$.

Weitere klinisch-chemische Befunde:

Die Allo-Ile/Ile-Ratio lag bei 0,15.

Aktivität der BCKDH in Hautfibroblasten: Die Decarboxylierungsaktivität für die verzweigtkettigen α -Ketosäuren (BCKA) ist gegenüber Kontrollen reduziert. Der Befund weist auf eine partielle Einschränkung der BCKA-Oxidation hin.

Beurteilung: Aufgrund der klinischen und klinisch-chemischen Daten dürfte es sich um eine **sehr leichte MSUD-Variante** handeln.

Tabelle 3.1: Daten bei Diagnosestellung einer MSUD

Patient	Geburtsjahr, Geschlecht	Alter bei Diagnose- stellung	Symptomatik bei Diagnosestellung	Leucin	Valin	Isoleucin	Allo- Isoleucin
				µmol/l			
Klassische MSUD							
N.S.	2005, m	4 Monate	Encephalopathie, Störung der psychomotorischen Entwicklung	4376	1204	742	277
M.S.	1987, m	21 LT	Encephalopathie, Hirnödem, tonische Krampfanfälle	1790	837	820	n.b.
A.H.	1993, m	11 LT	Encephalopathie, Koma	2733	675	344	k.A.
K.M.	2006, m	3 LT	Pos. Neugeborenencreening, leichte neurologische Symptomatik	1800	900	300	+++
J.H.	2005, w	4 LT	Pos. Neugeborenencreening, leichte neurologische Symptomatik	1675	487	292	159
I.V.	2006, w	3 LT	Pos. Neugeborenencreening, leichte neurologische Symptomatik	1180	670	339	169
Intermediäre/Intermittierende MSUD-Varianten							
S.W.	1992, w	13 Jahre	Encephalopathie mit Hirnödem, Tod	1460	1320	626	n.b.
E.H.	2005, m	16 LT	Pos. Neugeborenencreening, asymptomatisch	766	678	306	n.b.
J.S.	1991, w	14 Jahre	Encephalopathie bei fieberhaftem Infekt	1408	917	461	125
Noch asymptomatische MSUD-Varianten							
J.M.	2005, m	23 LT	Pos. Neugeborenencreening, asymptomatisch	253	268	131	7
C.D.	2006, w	6 LT	Pos. Neugeborenencreening, asymptomatisch	421	351	165	21
M.U.	2003, w	4 LT	Pos. Neugeborenencreening, asymptomatisch	407	470	152	31
J.J.	2005, w	k.A.	Pos. Neugeborenencreening, asymptomatisch	328	333	196	0
L.S.	2004, w	7 Monate	Fieberhafte Otitis media, metabolische Azidose, sonst unauffällig	607	922	317	n.b.

n.b.: Wert wurde zum Diagnosezeitpunkt nicht bestimmt, k.A.: keine Angabe verfügbar, +++: stark erhöht

Tabelle 3.2: Weitere Kenndaten: Therapiemaßnahmen, Anstieg der Plasma-Leucinkonzentrationen bei katabolem Stress, Allo-Isoleucin/Isoleucin-Ratio

<i>Patient</i>	<i>Therapie</i>	<i>Anstieg der Plasmaleucin-konzentration bei katabolem Stress</i>	<i>Allo-Isoleucin/Isoleucin-Ratio</i>
Klassische MSUD			
N.S.	Strenge MSUD-Diät	unbekannt	0,7
M.S.	Strenge MSUD-Diät	Bis 1350 µM	0,6
A.H.	Strenge MSUD-Diät	Bis > 1000 µM	0,7
K.M.	Strenge MSUD-Diät	Bis 500 µM	0,8
J.H.	Strenge MSUD-Diät	Bis 1140 µM	0,65
I.V.	Strenge MSUD-Diät	Bis 1050 µM	0,7 - 0,8
Intermediäre/intermittierende MSUD-Varianten			
S.W.	Bei Diagnosestellung verstorben	> 1460 µM	n.b.
E.H.	MSUD-Diät	Bis > 1300 µM	n.b.
J.S.	Proteinkontrollierte Diät	Bis 1408 µM	n.b.
Noch asymptomatische MSUD-Varianten			
J.M.	Proteinkontrollierte Ernährung	Bis 500 µM	0,07
C.D.	Milde MSUD-Diät	Bis 766 µM	0,15
M.U.	MSUD-Diät	Bis 500 µM	0,15
J.J.	keine	kein	0
L.S.	keine	Bis 500 µM	0

n.b.: Wert wurde nicht bestimmt

3.2 Genotypen der molekulargenetisch untersuchten Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde DNA von neun Patienten mit gesicherter MSUD (sechs mit klassischer MSUD, drei mit varianter MSUD mit schwerem Verlauf) und von fünf Personen aus einer Gruppe mit sehr milder MSUD bzw. unsicherer Diagnose molekulargenetisch untersucht. Zur Charakterisierung der molekulargenetischen Veränderungen wurden die *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gene mit den jeweils angrenzenden Intronsequenzen untersucht. Insgesamt wurden 15 wahrscheinlich krankheitsverursachende Mutationen, davon fünf im *BCKDHA*-Gen, sieben im *BCKDHB*-Gen und drei im *DBT*-Gen nachgewiesen. Zu den Bedingungen des autosomal-rezessiven Vererbungsmodus der MSUD passend, wurden bei acht der 14 Personen jeweils zwei mutierte Allele eines Gens gefunden. Bei zwei Personen wurde nur ein verändertes Allel für ein Gen gefunden. Bei einer Person wurden zwei mutierte Allele für zwei unterschiedliche Gene gefunden und bei drei Personen fand sich keine Mutation.

Nach Gruppen aufgeteilt fanden sich bei fünf von sechs Patienten mit klassischer MSUD jeweils zwei mutierte Allele eines Gens. In einem Fall wurde nur ein mutiertes Allel gefunden. Bei zwei von drei Patienten, die der Gruppe mit schwerer MSUD-Variante zugeordnet wurden, fanden sich jeweils zwei mutierte Allele auf einem Gen, während in einem Fall zwei mutierte Allele auf zwei unterschiedlichen Genen vorlagen. Von den fünf Personen aus der Gruppe mit sehr milder MSUD bzw. unsicherer Diagnose wurden nur bei einer Person zwei mutierte Allele auf einem Gen gefunden und bei einer Person ein mutiertes Allel auf einem der drei möglichen Gene. Bei drei Personen fand sich keine Mutation.

Im *BCKDHA*-Gen zeigten sich 5 verschiedene Polymorphismen und im *DBT*-Gen wurde ein Polymorphismus nachgewiesen.

3.2.1 Mutationen im *BCKDHA*-Gen

Exon 2 (Länge 180 bp):

Zu Beginn des Exon 2 befindet sich eine Abfolge von sieben Nukleotiden mit der Base Cytosin, die auf der cDNA die Positionen 111 bis 117 innehaben. Bei dem Patienten K.M. liegt in heterozygoter Form eine Deletion für eines dieser sieben Cytosinnukleotide

vor. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. Im Elektrophoresesignal sind die sich überlagernden Leseraster der beiden Allele zu sehen (**Abbildung 3.1**). Da man bei der Auswertung des Befundes nicht zwischen einem Cytosin des ursprünglichen Leserasters und einem Cytosin des verschobenen Leserasters unterscheiden kann, lässt sich mit dieser Methode nicht sagen, welches der sieben Cytosinnukleotide deletiert ist. Das neue Leseraster, das sich ergibt, ist aber für alle möglichen Positionen der Deletion dasselbe. Auf Proteinebene ist die Aminosäure Arginin an Kodonposition 40 die erste von der Mutation betroffene Aminosäure: Sie wird durch Glycin ersetzt. In der Folge kommt es durch den Frameshift zu einer veränderten Sequenz von 22 Aminosäuren, an deren Ende ein Stop-Kodon (TAG) liegt, das einen Kettenabbruch bewirkt. Diese Mutation ist als Arg40GlyfsX23 zu bezeichnen. Sie wurde durch Sequenzierung des Exon 2 in der DNA der Mutter von K.M. in heterozygoter Form bestätigt. Demgegenüber wies der Vater den Wildtyp auf. Eine weitere Mutation im *BCKDHA*-Gen wurde für den Patienten K.M. nicht nachgewiesen.

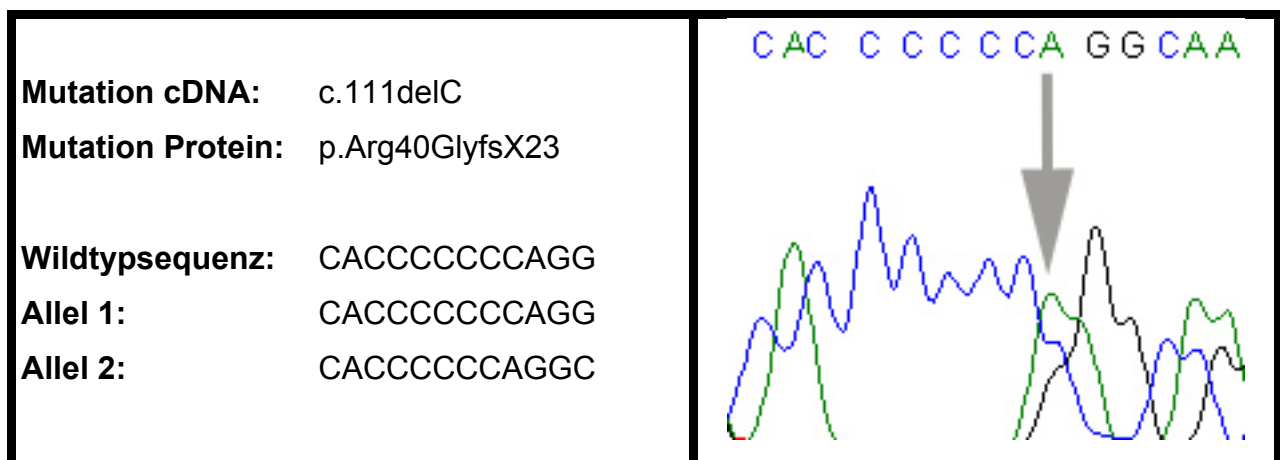


Abbildung 3.1: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Der Beginn des verschobenen Leserasters ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 4 (Länge 109 bp):

Die Transition der Base Cytosin an Position 452 der cDNA zu Thymin (ACG → ATG) resultiert in einem Ersatz der Aminosäure Threonin durch Methionin an Kodonposition 151. Diese Mutation Thr151Met wurde bei der Patientin J.S. in heterozygoter Form gefunden. Eine weitere Mutation im *BCKDHA*-Gen fand sich für diese Patientin nicht. DNA der Eltern lag nicht vor. Die **Abbildung 3.2** zeigt die Mutation.

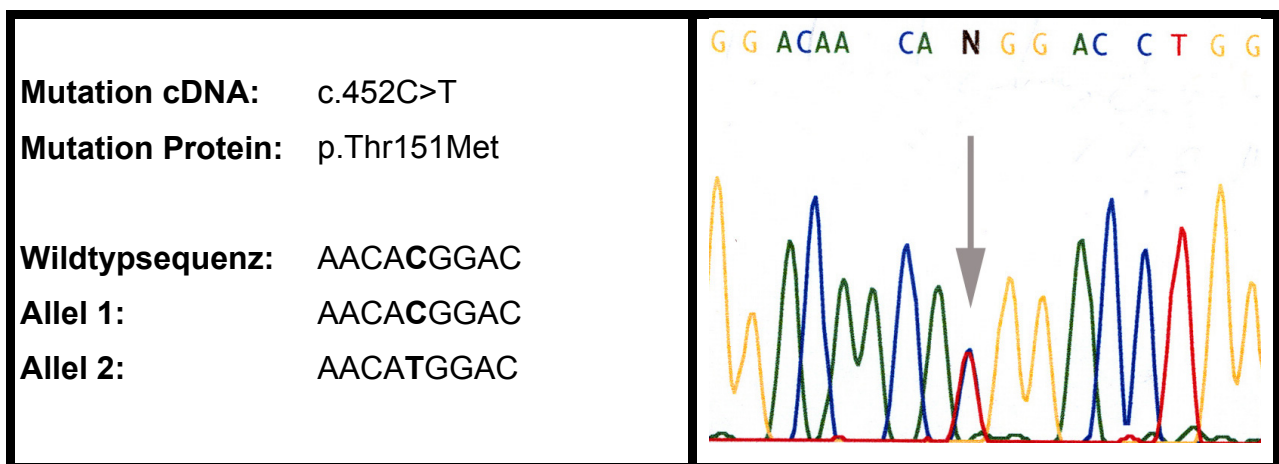


Abbildung 3.2: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid (N) ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 7 (Länge 142 bp):

Die Transition der Base Guanin an Position 890 der cDNA zu Adenin (CGC → CAC) resultiert in einem Ersatz der Aminosäure Arginin durch Histidin an Kodonposition 297. Diese Mutation Arg297His wurde bei dem Patienten E.H. in homozygoter Form nachgewiesen. Die **Abbildung 3.3** zeigt die Mutation. Bei den Eltern des Kindes wurde diese Mutation jeweils in heterozygoter Form nachgewiesen.

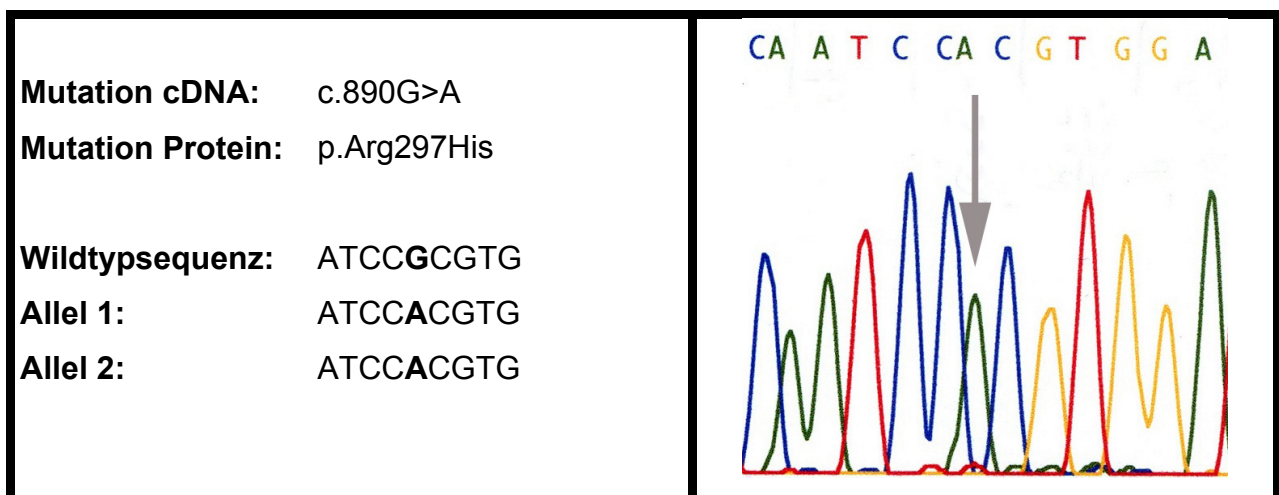


Abbildung 3.3: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 8 (Länge 172 bp):

Die Transition der Base Guanin an Position 1016 der cDNA zu Adenin (TGG → TAG) resultiert in einem Ersatz des Kodons für die Aminosäure Tryptophan durch ein Stop-Kodon an Kodonposition 354 mit der Konsequenz eines Kettenabbruchs. Die Patientin J.H. ist in heterozygoter Weise von dieser Mutation Trp354Stop betroffen. Die **Abbildung 3.4** zeigt diese heterozygote Mutation. Die Patientin J.H. weist in Exon 9 des *BCKDHA*-Gens eine weitere heterozygote Mutation auf. Beide Mutationen wurden bei den Eltern durch die Analyse der entsprechenden Genabschnitte jeweils in heterozygoter Form bestätigt.

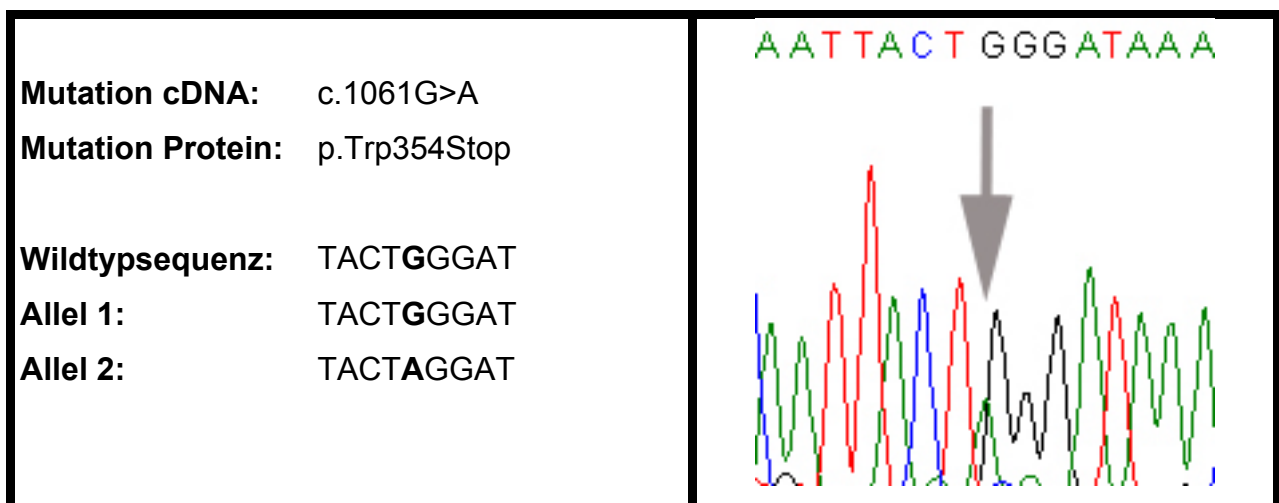


Abbildung 3.4: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 9 (Länge 171 bp):

Die Transversion der Base Thymin an Position 1312 der cDNA zu Adenin (TAC → AAC) resultiert in einem Ersatz der Aminosäure Asparagin durch Tyrosin an Kodonposition 438. Diese Mutation Tyr438Asn lag bei zwei Patienten vor, bei der Patientin J.H. in heterozygoter Form und bei dem Patienten N.S. in homozygoter Form. Die **Abbildungen 3.5 und 3.6** zeigen für J.H. diese Mutation in heterozygoter Form und für N.S. in homozygoter Form.

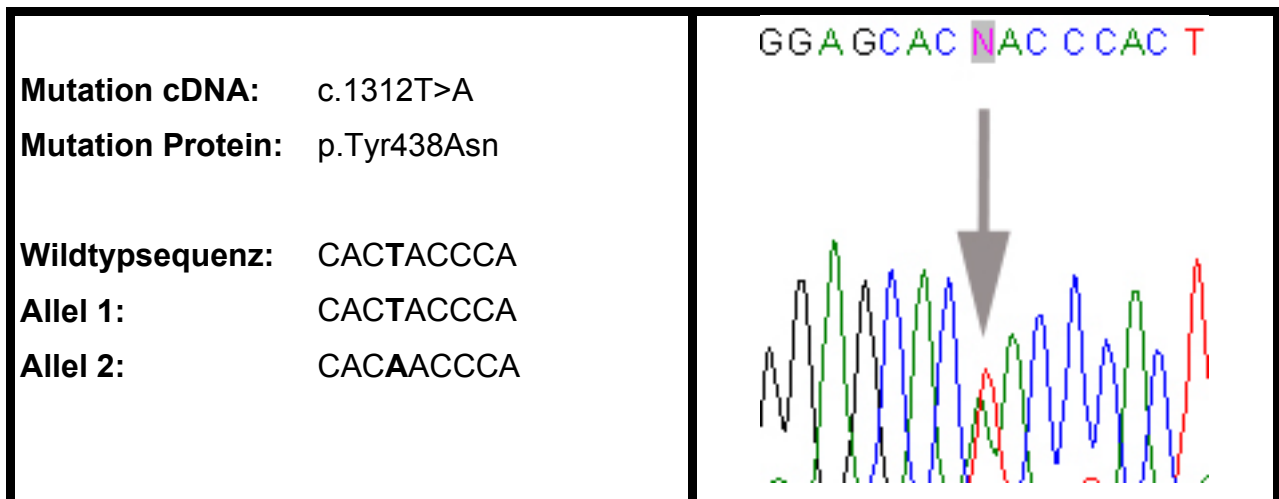


Abbildung 3.5: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid (N) ist mit einem Pfeil markiert.

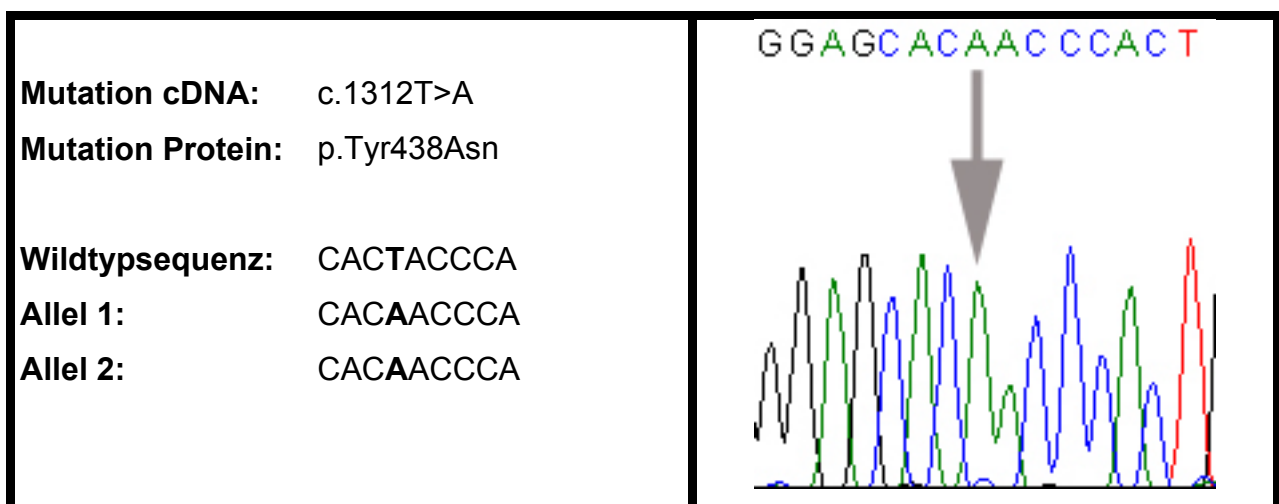


Abbildung 3.6: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

In den Exonen 1 (Länge 137 bp), 3 (87 bp), 5 (162 bp) und 6 (207 bp) des *BCKDHA*-Gens wurden mit den angewandten Methoden in dem untersuchten Kollektiv keine Mutationen gefunden.

Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die im *BCKDHA*-Gen nachgewiesenen Mutationen und nimmt Bezug auf den klinischen Phänotyp des jeweiligen Patienten.

Tabelle 3.3: Mutationen im *BCKDHA*-Gen (Typ IA Mutationen)

<i>Patient</i>	<i>Ethnische Herkunft</i>	<i>Exon</i>	<i>Mutation cDNA</i>	<i>Mutation Protein</i>	<i>Anzahl Allele</i>	<i>Klinischer Phänotyp</i>	<i>Vater</i>	<i>Mutter</i>
K.M.	RUS	2	c.111delC	p.Arg40GlyfsX23	1	klassisch	wt.	ht.
J.S.	D	4	c.452C>T	p.Thr151Met	1	schwere Variante	n.b.	n.b.
E.H.	TR	7	c.890G>A	p.Arg297His	2	schwere Variante	ht.	ht.
J.H.	D	8	c.1061G>A	p.Trp354Stop	1	klassisch	ht.	wt.
J.H.	D	9	c.1312T>A	p.Tyr438Asn	1	klassisch	wt.	ht.
N.S.	RUS	9	c.1312T>A	p.Tyr438Asn	2	klassisch	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt, da keine Blutprobe vorhanden.

Schwere Variante = intermediäre/intermittierende MSUD-Variante.

3.2.2 Polymorphismen im *BCKDHA*-Gen

Im *BCKDHA*-Gen wurden bei insgesamt 12 Patienten fünf Polymorphismen nachgewiesen. Diese sind alle bekannt und zum Teil als SNPs registriert.

1. Der (c.34C>A) Arg12Arg Polymorphismus lag bei einem Patienten in heterozygoter Form vor.

2. Der (c.116C>A) Pro39His Polymorphismus (registriert als SNP rs 34589432) lag bei vier Patienten jeweils in heterozygoter Form vor.
3. Der (c.708C>T) Phe236Phe Polymorphismus lag bei einem Patienten in heterozygoter Form vor.
4. Der (c.972C>T) Phe324Phe Polymorphismus (registriert als SNP rs 284652) lag bei vier Patienten in homozygoter Form und bei fünf Patienten in heterozygoter Form vor.
5. Der (c.1221A>G) Leu407Leu Polymorphismus (registriert als SNP rs 4647) lag bei vier Patienten in homozygoter Form und bei sieben Patienten in heterozygoter Form vor.

3.2.3 Mutationen im *BCKDHB*-Gen

Exon 1 (Länge 243 bp):

Eine Transition von Guanin zu Adenin (GCC→ACC) an Position 115 der cDNA führt zu einem Ersatz von Alanin durch Threonin an der Kodonposition 39. Diese Mutation Ala39Thr wurde bei der Patientin J.J. in heterozygoter Form gefunden. Die **Abbildung 3.7** zeigt diese Mutation. Für die Patientin ließ sich keine weitere Mutation im *BCKDHB*-Gen nachweisen.

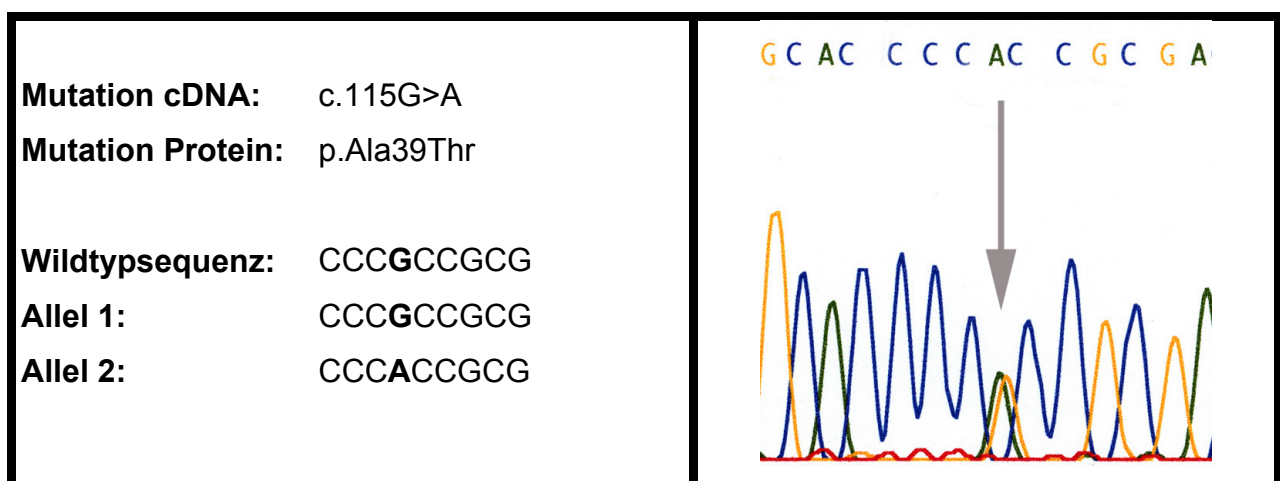


Abbildung 3.7: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei

verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 5 (Länge 156 bp):

Die Transversion von Adenin zu Thymin (AAC→TAC) an Position 526 der cDNA führt zu einem Ersatz von Asparagin durch Tyrosin an der Kodonposition 176. Diese Mutation Asn176Tyr wurde bei dem Patienten J.M. in heterozygoter Form gefunden.

Abbildung 3.8 zeigt diese Mutation. Der Patient weist eine zweite heterozygote Mutation in Exon 7 des *BCKDHB*-Gens auf.

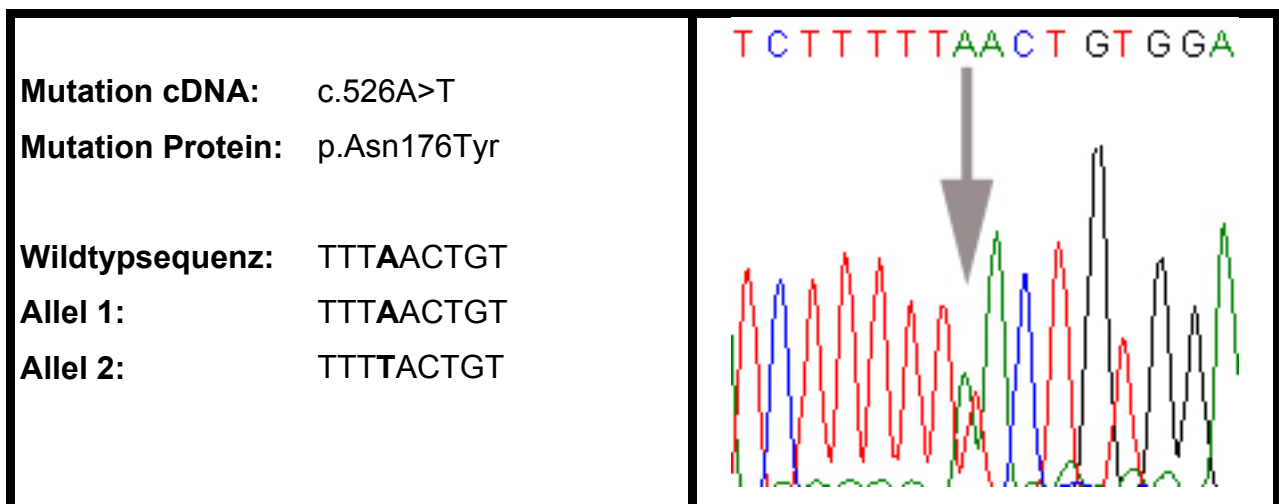


Abbildung 3.8: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

Die Transition von Cytosin zu Thymin (CGG→TGG) an Position 547 der cDNA führt zu einem Ersatz von Arginin durch Tryptophan an der Kodonposition 183. Diese Mutation Arg183Trp wurde bei der Patientin I.V. in homozygoter Form und bei ihren Eltern jeweils in heterozygoter Form gefunden. **Abbildung 3.9** zeigt diese Mutation.

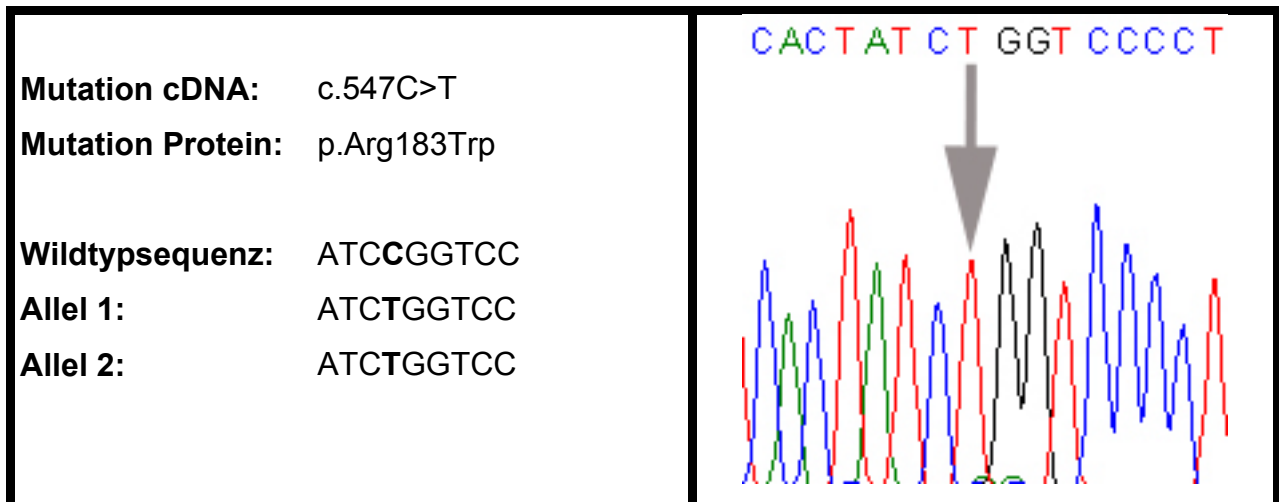


Abbildung 3.9: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 7 (Länge 98 bp):

Die Transition von Guanin zu Adenin (GGC → AGC) an Position 832 der cDNA führt zu einem Ersatz von Glycin durch Serin an der Kodonposition 278. Diese Mutation Gly278Ser wurde bei dem Patienten J.M. in heterozygoter Form gefunden. **Abbildung 3.10** zeigt diese Mutation. Der Patient weist eine zweite heterozygote Mutation in Exon 5 des *BCKDHB*-Gens auf.

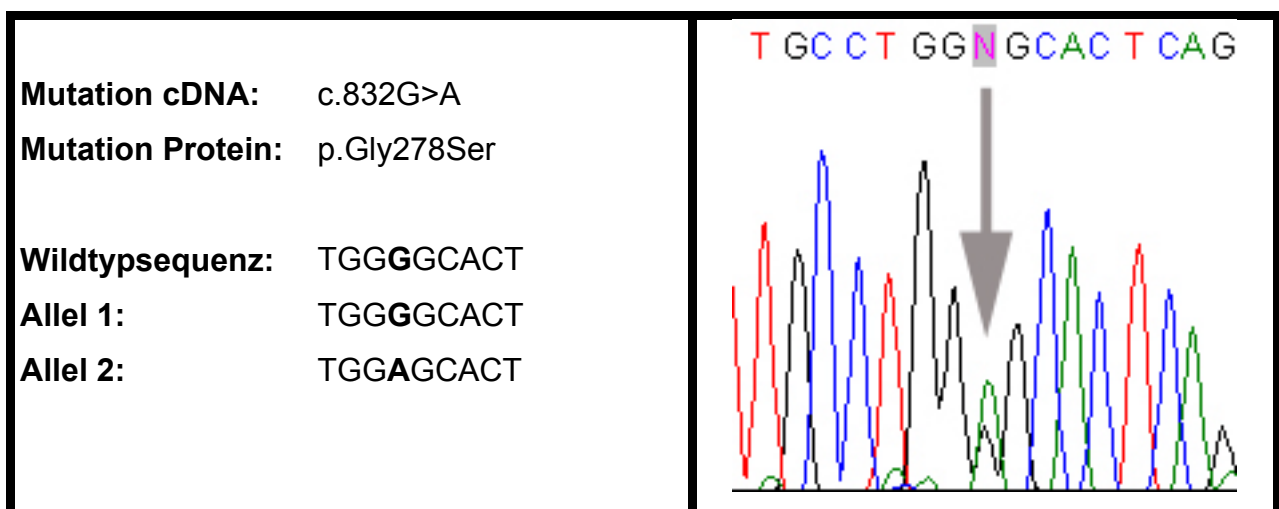


Abbildung 3.10: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid (N) ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 9 (Länge 87 bp):

Die Transition von Cytosin zu Thymin (TCT → TTT) an Position 953 der cDNA führt zu einem Ersatz von Serin durch Phenylalanin an der Kodonposition 318. Diese Mutation Ser318Phe wurde bei dem Patienten M.S. in heterozygoter Form gefunden. **Abbildung 3.11** zeigt diese Mutation. Der Patient weist eine zweite heterozygote Mutation in diesem Exon (Exon 9) des *BCKDHB*-Gens auf.

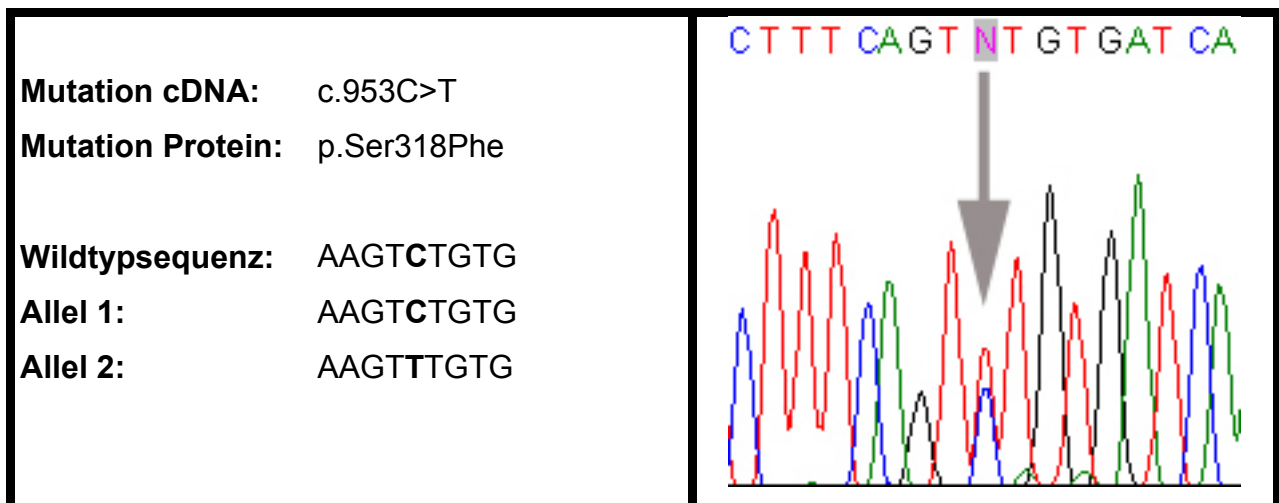


Abbildung 3.11: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid (N) ist mit einem Pfeil markiert.

Die Transversion von Adenin zu Thymin (CAC→CTC) an Position 986 der cDNA führt zu einem Ersatz von Histidin durch Leucin an der Kodonposition 329. Diese Mutation His329Leu ist die zweite heterozygote Mutation im *BCKDHB*-Gens des Patienten M.S. **Abbildung 3.12** zeigt diese Mutation.

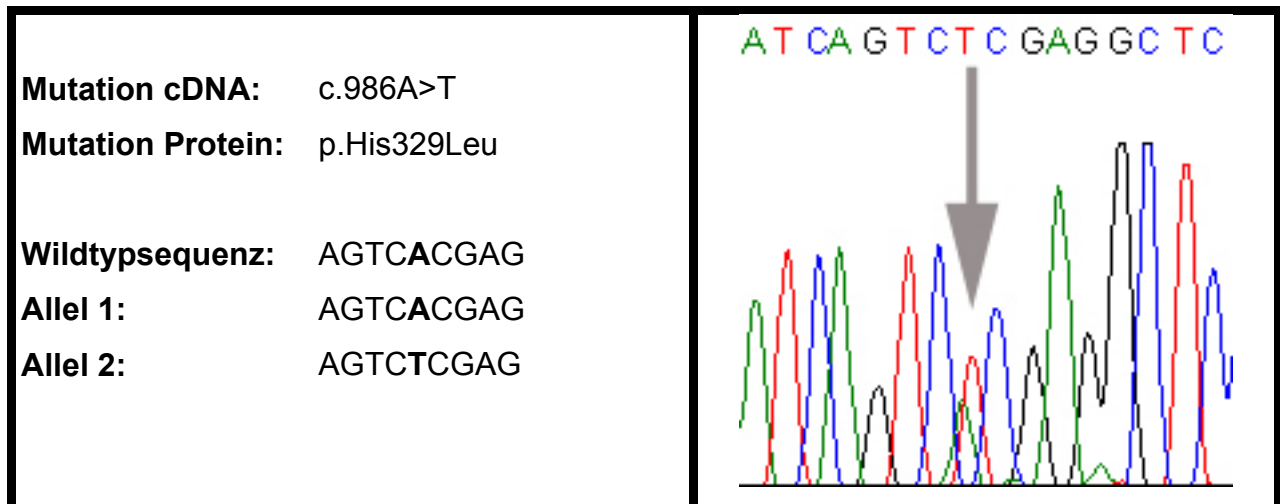


Abbildung 3.12: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

Die Transition von Cytosin zu Thymin (CCC→CTC) an Position 995 der cDNA führt zu einem Ersatz von Prolin durch Leucin an der Kodonposition 332. Diese Mutation Pro332Leu wurde bei dem Patienten A.H. in homozygoter Form gefunden und bei seinen Eltern jeweils in heterozygoter Form. **Abbildung 3.13** zeigt diese Mutation.

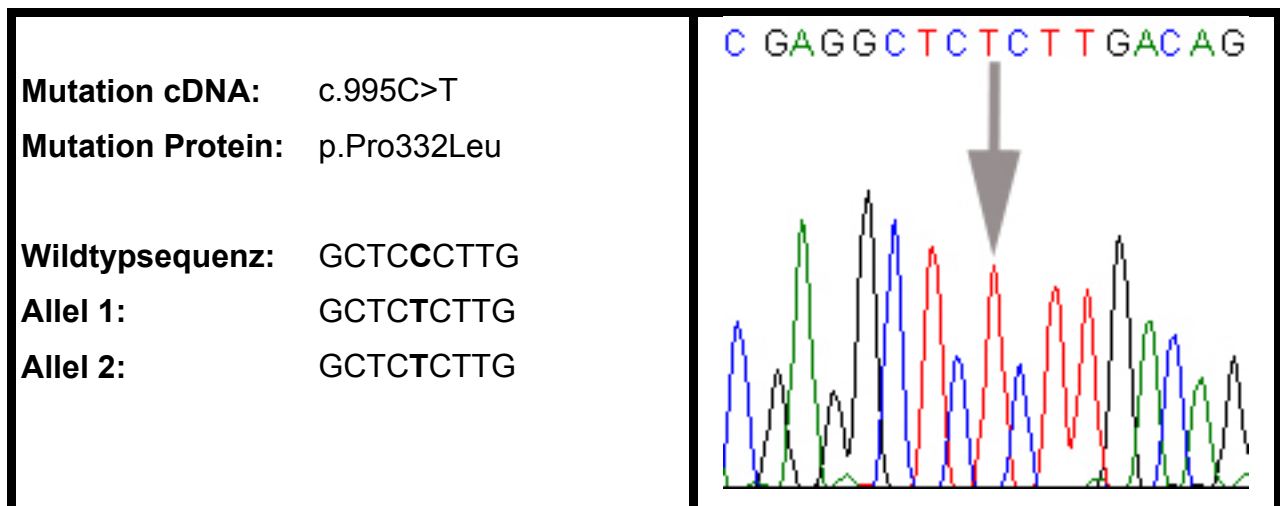


Abbildung 3.13: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

In den Exonen 2 (Länge 78 bp), 3 (69 bp), 4 (134 bp), 6 (109 bp), 8 (111 bp) und 10 (148 bp) des *BCKDHB*-Gens wurden mit den angewandten Methoden in dem untersuchten Kollektiv keine Mutationen gefunden.

Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die im *BCKDHB*-Gen nachgewiesenen Mutationen und nimmt Bezug auf den klinischen Phänotyp des jeweiligen Patienten/Probanden.

Tabelle 3.4: Mutationen im *BCKDHB*-Gen (Typ IB Mutationen)

Patient	Ethnische Herkunft	Exon	Mutation cDNA	Mutation Protein	Anzahl Allele	Klinischer Phänotyp	Vater	Mutter
J.J.	USA	1	c.115G>A	p.Ala39Thr	1	asymptomatische Variante	wt.	ht.
J.M.	D	5	c.526A>T	p.Asn176Tyr	1	asymptomatische Variante	n.b.	n.b.
I.V.	TR	5	c.547C>T	p.Arg183Trp	2	klassisch	ht.	ht.
J.M.	D	7	c.832G>A	p.Gly278Ser	1	asymptomatische Variante	n.b.	n.b.
M.S.	D	9	c.953C>T	p.Ser318Phe	1	klassisch	n.b.	n.b.
M.S.	D	9	c.986A>T	p.His329Leu	1	klassisch	n.b.	n.b.
A.H.	LIB	9	c.995C>T	p.Pro332Leu	2	klassisch	ht.	ht.

n.b.: nicht bestimmt, da keine Blutprobe vorhanden.

3.2.4 Polymorphismen im *BCKDHB*-Gen

Es fanden sich keine Polymorphismen im *BCKDHB*-Gen.

3.2.5 Mutationen im *DBT*-Gen

Exon 2 (Länge 124 bp):

Die Deletion von Adenin und Thymin an den Positionen 75 und 76 der cDNA verursacht eine Verschiebung des Leserasters. Die Aminosäure Cystein an Position 26 wird zu Tryptophan und direkt an nächster Position entsteht ein Stop-Kodon (TAA), das zum Kettenabbruch führt. Im Elektrophoresesignal sieht man die sich überlagernden Leseraster der beiden Allele (**Abbildung 3.14**). Diese Mutation Cys26TrpfsX1 fand sich bei der Patientin S.W. in heterozygoter Form. Sie war auch bei ihrem Vater in heterozygoter Form nachweisbar. Eine zweite heterozygote Mutation fand sich für S.W. in Exon 7 des *DBT*-Gens.

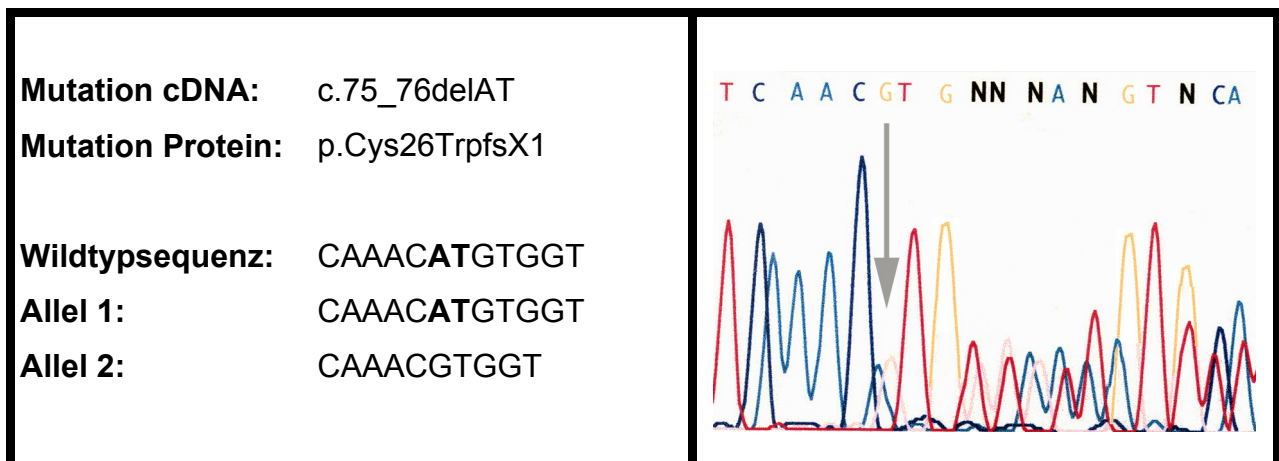


Abbildung 3.14: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, die fehlenden Nukleotide sind hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Der Beginn des verschobenen Leserasters ist mit einem Pfeil markiert.

Exon 7 (Länge 167 bp):

Die Transition von Cytosin zu Thymin (CGT → TGT) an Position 901 der cDNA führt zu einem Ersatz von Arginin durch Cystein an der Kodonposition 301. Diese Mutation Arg301Cys wurde bei der Patientin J.S. in heterozygoter Form gefunden. **Abbildung 3.15** zeigt die Mutation. Eine weitere Mutation im *DBT*-Gen fand sich bei der Patientin nicht.

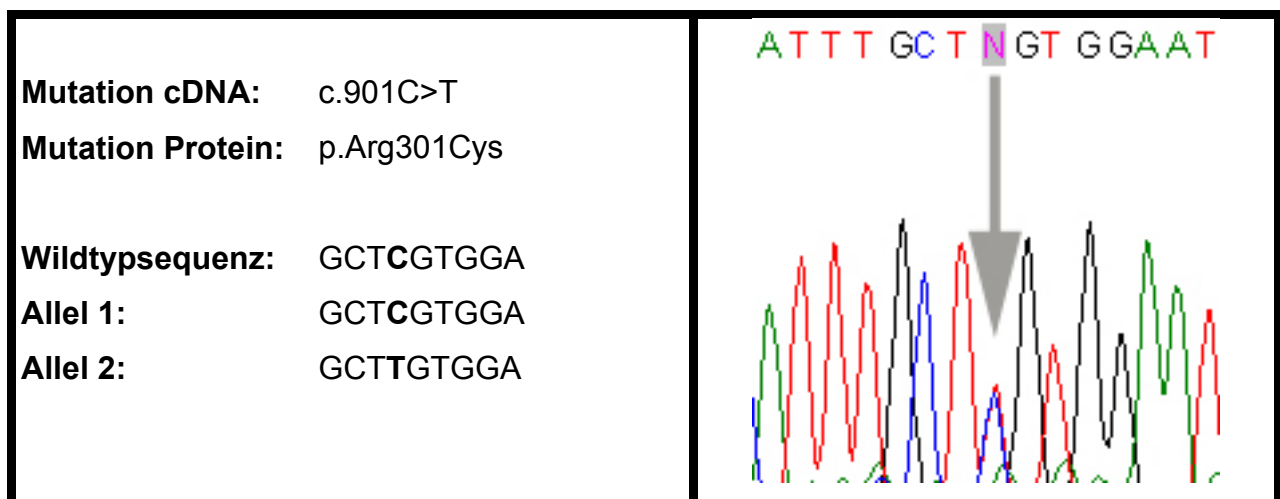


Abbildung 3.15: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid (N) ist mit einem Pfeil markiert.

Die Transition von Thymin zu Cytosin (TTT → TCT) an Position 920 der cDNA führt zu einem Ersatz von Phenylalanin durch Serin an der Kodonposition 307. Diese Mutation Phe307Ser wurde bei der Patientin S.W. sowie bei ihrer Mutter jeweils in heterozygoter Form gefunden. **Abbildung 3.16** zeigt diese Mutation. Eine zweite heterozygote Mutation fand sich für S.W. in Exon 2 des *DBT*-Gens.

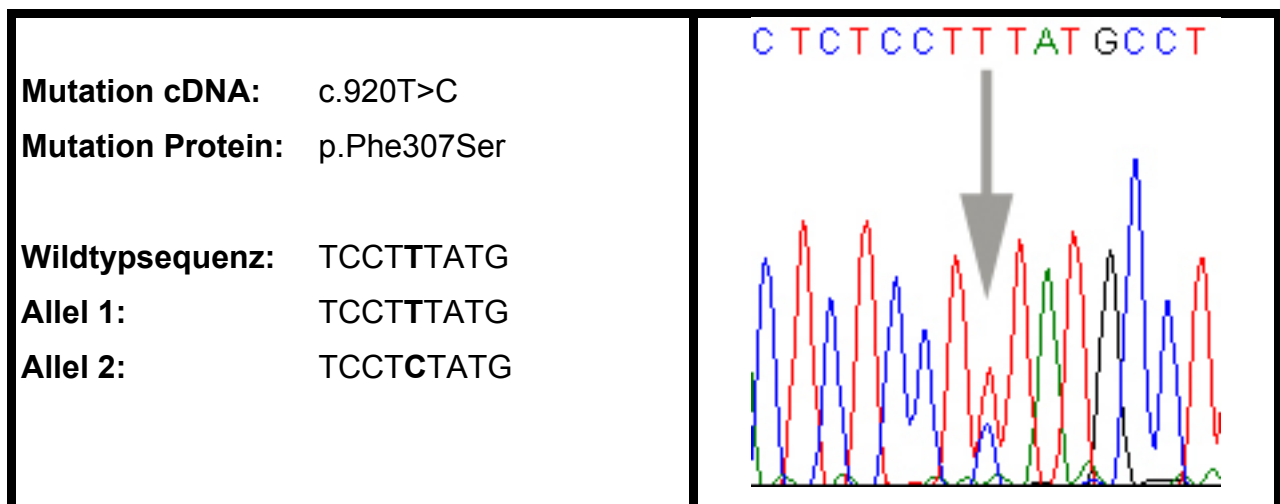


Abbildung 3.16: In der linken Hälfte ist ein Vergleich der Wildtypsequenz und der Sequenz auf den beiden Allelen des Patienten dargestellt, das veränderte Nukleotid ist hierbei fett gedruckt. Rechts ist das entsprechende Nukleotidelektrophoresesignal zu sehen. Hierbei entspricht ein Signal zwei gleichen Nukleotiden, also einem homozygoten Zustand und zwei sich überlappende Signale entsprechen zwei verschiedenen Nukleotiden, also einem heterozygoten Zustand. Das veränderte Nukleotid ist mit einem Pfeil markiert.

In den Exonen 1 (Länge 65 bp), 3 (76 bp), 4 (182 bp), 5 (122 bp), 6 (217 bp), 8 (78 bp), 9 (192 bp), 10 (72 bp) und 11 (169 bp) des *DBT*-Gens wurden mit den angewandten Methoden in dem untersuchten Kollektiv keine Mutationen gefunden.

Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über die im *DBT*-Gen nachgewiesenen Mutationen und nimmt Bezug auf den klinischen Phänotyp des jeweiligen Patienten.

Tabelle 3.5: Mutationen im *DBT*-Gen (Typ II Mutationen)

Patient	Ethnische Herkunft	Exon	Mutation cDNA	Mutation Protein	Anzahl Allele	Klinischer Phänotyp	Vater	Mutter
S.W.	D	2	c.75_76delAT	p.Cys26TrpfsX1	1	schwere Variante	ht.	wt.
J.S.	D	7	c.901C>T	p.Arg301Cys	1	schwere Variante	n.b.	n.b.
S.W.	D	7	c.920T>C	p.Phe307Ser	1	schwere Variante	wt.	ht.

n.b.: nicht bestimmt, da keine Blutprobe vorhanden.

Schwere Variante = intermediäre/intermittierende MSUD-Variante.

3.2.6 Polymorphismen im *DBT*-Gen

Im *DBT*-Gen wurde bei 2 Patienten der bekannte Polymorphismus (c.1150G>A) Gly384Ser (registriert als SNP rs 12021720) jeweils in heterozygoter Form nachgewiesen.

Tabelle 3.6 gibt einen Überblick über alle gefundenen Mutationen.

Tabelle 3.6: Überblick über die molekulargenetischen Befunde

<i>Patient</i>	<i>Ethnische Herkunft</i>	<i>Gen (Exon)</i>	<i>Mutation cDNA</i>	<i>Mutation genom. DNA</i>	<i>Mutation Protein</i>	<i>Anzahl Allele</i>	<i>Vater</i>	<i>Mutter</i>
Klassische MSUD								
N.S.	RUS	<i>BCKDHA</i> (9)	c.1312T>A	g.26784	p.Tyr438Asn	2	n.b.	n.b.
M.S.	D	<i>BCKDHB</i> (9)	c.953C>T	g.166490	p.Ser318Phe	1	n.b.	n.b.
		<i>BCKDHB</i> (9)	c.986A>T	g.166523	p.His329Leu	1	n.b.	n.b.
A.H.	LIB	<i>BCKDHB</i> (9)	c.995C>T	g.166532	p.Pro332Leu	2	ht.	ht.
K.M.	RUS	<i>BCKDHA</i> (2)	c.111delC	g.12841	p.Arg40GlyfsX23	1	wt.	ht.
J.H.	D	<i>BCKDHA</i> (8)	c.1061G>A	g.25265	p.Trp354Stop	1	ht.	wt.
		<i>BCKDHA</i> (9)	c.1312T>A	g.26784	p.Tyr438Asn	1	wt.	ht.
I.V.	TR	<i>BCKDHB</i> (5)	c.547C>T	g.62298	p.Arg183Trp	2	ht.	ht.
Intermediäre/intermittierende MSUD-Varianten								
S.W.	D	<i>DBT</i> (2)	c.75_76delAT	g.8974_8975	p.Cys26TrpfsX1	1	ht.	wt.
		<i>DBT</i> (7)	c.920T>C	g.34999	p.Phe307Ser	1	wt.	ht.
E.H.	TR	<i>BCKDHA</i> (7)	c.890G>A	g.24867	p.Arg297His	2	ht.	ht.
J.S.	D	<i>BCKDHA</i> (4)	c.452C>T	g.16327	p.Thr151Met	1	n.b.	n.b.
		<i>DBT</i> (7)	c.901C>T	g.34980	p.Arg301Cys	1	n.b.	n.b.
Noch asymptomatische MSUD-Varianten								
J.M.	D	<i>BCKDHB</i> (5)	c.526A>T	g.62277	p.Asn176Tyr	1	n.b.	n.b.
		<i>BCKDHB</i> (7)	c.832G>A	g.94377	p.Gly278Ser	1	n.b.	n.b.
C.D.	TR	-	wt.	-	-	-	-	-
M.U.*	TR	-	wt.	-	-	-	-	-
J.J.	USA	<i>BCKDHB</i> (1)	c.115G>A	g.162	p.Ala39Thr	1	wt.	ht.
L.S.	LIB	-	wt.	-	-	-	-	-

*: Sequenzierung erfolgte durch Frau M. Müller, MTA, Universitätsklinikum Düsseldorf,

n.b.: nicht bestimmt, da keine Blutprobe vorhanden.

IV. Diskussion

4.1 Zur phänotypischen Zuordnung der Patienten vor Durchführung der Mutationsanalytik

Bei insgesamt sechs Personen ergab sich die Diagnose/Verdachtsdiagnose einer MSUD aufgrund des klinischen Verlaufs. Die Patienten fielen durch die Symptomatik einer schweren Encephalopathie auf. Diese zeigte sich entweder bereits in den ersten Lebenstagen oder aber im Kindes- und Jugendalter, ausgelöst durch einen „katabolen Stress“ im Rahmen einer fieberhaften Erkrankung. Während die Patienten mit neonataler Präsentation (N.S., M.S., A.H.) eindeutig die klinischen und laborchemischen Charakteristika einer klassischen MSUD aufwiesen, passen die klinischen und laborchemischen Charakteristika bei den beiden jugendlichen Mädchen (J.S., S.W) eindeutig zu einer intermittierenden MSUD-Variante.

Bei sorgfältiger Analyse der Daten des Mädchens L.S. ist die Verdachtsdiagnose MSUD nicht haltbar. Weder sprachen die klinische Präsentation (keine Zeichen einer Encephalopathie während einer fieberhaften Otitis mit mäßig erhöhten BCAA-Plasmakonzentrationen) noch die Laborbefunde (kein Allo-Ile nachweisbar, keine Einschränkung der BCKA-Oxidation in kultivierten Fibroblasten) für das Vorliegen einer MSUD-Variante (vom intermittierenden Typ). Streng genommen bestand keine Indikation zur weiterführenden molekulargenetischen Analyse (**Anmerkung:** Bei dem Mädchen wurde auch in der molekulargenetischen Analyse keine Mutation gefunden).

Bei acht Neugeborenen wurde die Verdachtsdiagnose einer MSUD aufgrund eines für die MSUD verdächtigen Befundes im Neugeborenenenscreening gestellt und bedurfte einer Konfirmationsdiagnostik. Diese acht Kinder lassen sich wie folgt einem unterschiedlichen Schweregrad der MSUD zuordnen.

Die Kinder K.M., J.H. und I.V. hatten sämtlich am 4. Lebenstag leichte aber eindeutige Zeichen einer Encephalopathie und wiesen sehr stark erhöhte Plasma-Leucinspiegel ($> 1000 \mu\text{mol/l}$) auf. Damit sprachen die klinische Symptomatik und die laborchemischen Daten eindeutig für das Vorliegen einer klassischen MSUD.

Der Patient E.H. hatte zwar von Geburt an mäßiggradig erhöhte BCAA-Spiegel, aber offenbar waren diese mit oder ohne Therapie niemals ausreichend hoch, um eine encephalopathische Symptomatik zu bewirken. Erst im Alter von drei Jahren kam es, ausgelöst durch einen „katabolen Stress“ im Rahmen einer fieberhaften Erkrankung, zu einem Anstieg des Leucinspiegels auf über 1000 µmol/l und zu einer begleitenden Encephalopathie. Aufgrund dieser Symptomatik ist der Patient eindeutig einer MSUD-Variante (intermittierende oder intermediäre Form) zuzuordnen.

Zusammenfassend waren bei diesen vier im Neugeborenencreening erkannten Patienten die klinischen und laborchemischen Daten hinreichend für die Bestätigung einer MSUD und eine molekulargenetische Analyse zur Diagnosesicherung wäre nicht zwingend erforderlich gewesen.

Anders ist die Situation bei den restlichen vier im Neugeborenencreening aufgefallenen Kindern, da sie bisher nie, auch nicht während eines katabolen Stresses, Zeichen einer toxischen Encephalopathie und keine Leucinspiegel über 1000 µmol/l aufwiesen. Aufgrund der klinischen Symptomatik weist bisher nichts auf eine MSUD hin. Allenfalls könnte es sich um leichte eventuell asymptomatische MSUD-Varianten handeln, wie sie von *Simon et al. (2006a)* beschrieben wurden.

Für diese Gruppe von Kindern (J.M., C.D., M.U. und J.J.) stellt sich die Frage, ob die Diagnose einer leichten MSUD-Variante mit hinreichender Sicherheit allein durch die Messung geeigneter klinisch-chemischer Parameter gestellt werden kann, oder ob eine zusätzliche molekulargenetische Analyse wünschenswert oder erforderlich ist.

Um diese Frage zu beantworten, sollen die Ergebnisse der für die Konfirmationsdiagnostik herangezogenen klinisch-chemischen Parameter kritisch besprochen werden.

Folgende Laborbefunde wurden hierzu herangezogen:

1. Höhe der Plasmakonzentrationen der BCAA zum Zeitpunkt der Konfirmationsdiagnostik.
2. Ausmaß des Anstiegs der Plasmakonzentrationen der BCAA unter Stoffwechselstress im Rahmen fieberhafter interkurrenter Erkrankungen.
3. Höhe der Plasmakonzentration von Allo-Isoleucin zum Zeitpunkt der Konfirmationsdiagnostik.
4. Allo-Isoleucin/Isoleucin-Ratio im Verlauf unter stabilen Stoffwechselbedingungen.

5. Restaktivität der BCKDH in Fibroblasten.

Ad 1.: Bei allen 4 Neugeborenen wurden im Rahmen der Konfirmationsdiagnostik mit 253, 421, 328 und 407 $\mu\text{mol/l}$ (entsprechend dem 1,6- bis 2,8-fachen des oberen Referenzbereichs) nur relativ leicht erhöhte Leucinspiegel gemessen, wie sie bei einer sehr leichten Variante der MSUD zu erwarten sind, und bei denen keine Symptome zu erwarten sind. Diese Daten sind auch unter der Einschränkung, dass die Messungen in verschiedenen Laboratorien und auch mit verschiedenen Methoden erfolgten, als valide anzusehen.

Im weiteren Verlauf lagen die Plasmaspiegel der BCAA (zum Teil unter einer leicht im Proteingehalt eingeschränkten Ernährung) für drei Kinder überwiegend in einem leicht erhöhten Bereich. Für J.J. wurden auch ohne Einschränkungen in der Ernährung BCAA-Spiegel in den Referenzbereichen berichtet.

Ad 2.: Unter Phasen eines katabolen Stresses wurden Plasma-Leucinspiegel um 500 $\mu\text{mol/l}$ (für J.M. und M.U.) und 750 $\mu\text{mol/l}$ (für C.D.), jeweils ohne begleitende neurologische Symptome, berichtet. Für J.J. wurde bisher kein entsprechender Anstieg berichtet.

Ad 3.: Es wurden folgende Allo-Ile Konzentrationen gemessen: 7 $\mu\text{mol/l}$ für J.M., 21 $\mu\text{mol/l}$ für C.D., 31 $\mu\text{mol/l}$ für M.U. Für J.J. wurde Allo-Isoleucin nicht erhöht gefunden. Obwohl auch diese Werte - mit geeigneter Methode - in zwei verschiedenen Laboratorien (Berlin, Düsseldorf) erstellt wurden, sind sie als valide anzusehen.

Ad 4.: Bei drei Kindern wurde die Allo-Ile/Ile-Ratio mit 0,07, 0,15 und 0,15 bestimmt, was Werten für sehr leichte MSUD-Varianten entspricht. Für J.J. ließ sich diese Ratio nicht bestimmen, da Allo-Ile nicht erhöht gefunden wurde.

Ad 5.: Die Messung der BCKDH-Aktivität erfolgte für die Kinder J.M., C.D. und M.U. in intakten Fibroblasten als Dekarboxylierung von 1-¹⁴C-Leucin unter streng kontrollierten Bedingungen im Stoffwechsellabor der Universitätskinderklinik Düsseldorf. Die erhobenen Daten ließen keine zahlenmäßige Festlegung der Restaktivität im Vergleich zu mitgeführten Zellen von Personen ohne MSUD zu. Dementsprechend wurden die

Ergebnisse aus dem Labor folgendermaßen mitgeteilt: In den Fibroblasten der Kinder J.M. und C.D. wurde die Decarboxylierungsaktivität für BCKA unterhalb der von Normalkontrollen gefunden. Das sprach für eine partielle Störung der BCKA-Oxidation. In den Fibroblasten des Kindes M.U. wurde in dreifachen Untersuchungsansätzen kein Hinweis auf eine beeinträchtigte BCKA-Oxidation gefunden.

Die Eltern des Kindes J.J. verweigerten bei ihrem Kind die Entnahme von Haut zur Anzucht von Fibroblasten. Dementsprechend stand für eine Messung der BCKA-Oxidation bei diesem Kind kein Material zur Verfügung.

Diese Untersuchungsmethode ist von allen für die Bestätigung einer MSUD verwendeten Methoden die problematischste, da die Aktivität des zu messenden BCKDH-Enzymkomplexes einer intensiven metabolischen Kontrolle unterliegt. Zum Beispiel ist in Zellen unter „normalen Kulturbedingungen“ nur etwa 50 % des BCKDH-Komplexes aktiv und es ist zu erwarten, dass durch relativ geringe Änderungen der Kulturbedingungen die Aktivität des BCKDH-Komplexes variieren kann (*Mersey et al., 2005; Shimomura et al., 2009*). Darüber, ob entsprechende Vorgänge dazu führen können, dass für das Kind M.U. eine uneingeschränkte BCKA-Oxidation gefunden wurde, kann nur spekuliert werden. Auf alle Fälle ist für die Beurteilung einschränkend zu vermerken, dass die Kultur der Fibroblasten auswärts erfolgte und die Zellen zur Testung nach Düsseldorf geschickt wurden. Auch wurden die Zellen vor dem Test nicht auf Mykoplasmainfektion untersucht. Es ist denkbar, dass eine Mykoplasmakontamination eine leicht verminderte BCKA-Oxidation maskieren kann.

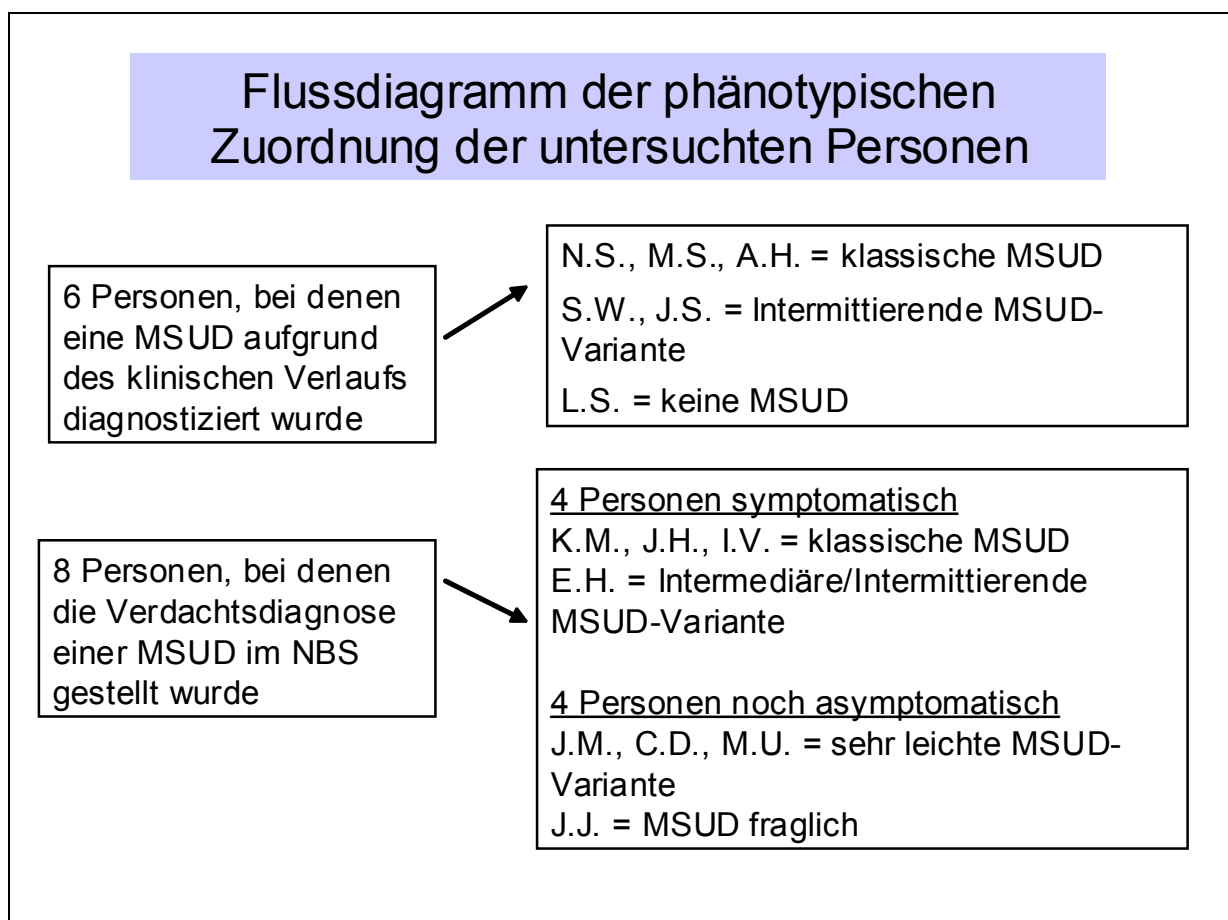
Zusammenfassend ergeben sich bei der kritischen Wertung der Laborbefunde vor Mutationsanalyse für die Kinder J.M., C.D. und M.U. eindeutige Zeichen für das Vorliegen einer sehr leichten MSUD-Variante. Für J.J. bestehen Zweifel, ob tatsächlich eine MSUD vorliegt. Trotz der Laborbefunde erscheint es in jedem Falle sinnvoll, die Diagnose einer MSUD durch Mutationsanalyse der krankheitsspezifischen Gene abzusichern.

Tabelle 4.1 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der verschiedenen klinisch-chemischen Parameter, welche im Rahmen der Konfirmationsdiagnostik für MSUD bei vier im Neugeborenencreening identifizierten Kindern mit bisher asymptomatisch verlaufender MSUD herangezogen wurden:

	<i>J.M.</i>	<i>C.D.</i>	<i>M.U.</i>	<i>J.J.</i>
Erhöhte BCAA-Spiegel	+	+	+	+
BCAA-Anstieg unter Stress	+	+	+	–
Allo-Ile erhöht	+	+	+	–
Allo-Ile/Ile-Ratio	0,07	0,15	0,15	∅
Eingeschränkte BCKA-Oxidation	+	+	–	n.b.

Tabelle 4.1: Zusammenfassende Darstellung der klinisch-chemischen Parameter. + steht für „vorhanden“, – für „fehlend“.

Die phänotypische Zuordnung von allen 14 untersuchten Personen wird im folgenden Flussdiagramm dargestellt:



4.2 **Mögliche Konsequenzen der gefunden Mutationen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der E1- ($E1\alpha$ - und $E1\beta$ -) und E2- Untereinheiten des BCKDH-Multienzymkomplexes**

Bei allen 14 Personen wurde eine molekulargenetische Charakterisierung des *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und des *DBT*-Gens vorgenommen. Dabei wurden 15 verschiedene Mutationen und sechs Polymorphismen gefunden.

Aufgrund röntgenkristallographischer Untersuchungen der E1-Untereinheit des BCKDH-Komplexes des Menschen (*Ævarsson et al., 2000*) und der E2-Untereinheit beim Rind (*Kato et al., 2006*) ist eine Aussage über die Lokalisation der Mutationen im Protein und die dadurch bedingte Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur möglich.

Die im Folgenden aus der Literatur zitierten Mutationsbezeichnungen sind auf den Stand von 2009 aktualisiert worden.

4.2.1 **Mutationen im BCKDHA-Gen**

Mutationen im *BCKDHA*-Gen werden als Typ-IA-Mutationen bezeichnet (*Chuang & Shih, 2001*). Bis November 2008 waren etwa 50 Typ-IA-Mutationen bekannt (*Chuang et al., 2008*). Die Mutationen waren ohne Bildung von Clustern in bestimmten Abschnitten über das gesamte Gen verteilt. Typ-IA-Mutationen wurden mit dem klinischen Phänotyp einer klassischen Ahornsirupkrankheit assoziiert. Inzwischen wird diese Assoziation aber weniger zwingend gesehen (*Chuang et al., 2008*).

In dieser Arbeit wurden 28 Allele des *BCKDHA*-Genlocus von Personen mit der Diagnose/Verdachtsdiagnose MSUD untersucht. Dabei wurden fünf unterschiedliche Typ IA-Mutationen in acht Allelen gefunden (siehe **Tabelle 3.3**). Dies entspricht einem Drittel der 15 unterschiedlichen, wahrscheinlich krankheitsverursachenden Mutationen, die für diese Personengruppe in den *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Genen identifiziert wurden.

Außerdem wurden im *BCKDHA*-Gen fünf unterschiedliche Polymorphismen gefunden.

Abbildung 4.1 zeigt die Sekundärstruktur der $E1\alpha$ -Untereinheit des Multienzymkomplexes der BCKDH des Menschen und von *Pseudomonas putida*.

Anhand dieser Abbildung und der daraus abgeleiteten Tertiärstruktur des Proteins werden die Mutationen im Folgenden weiter analysiert.

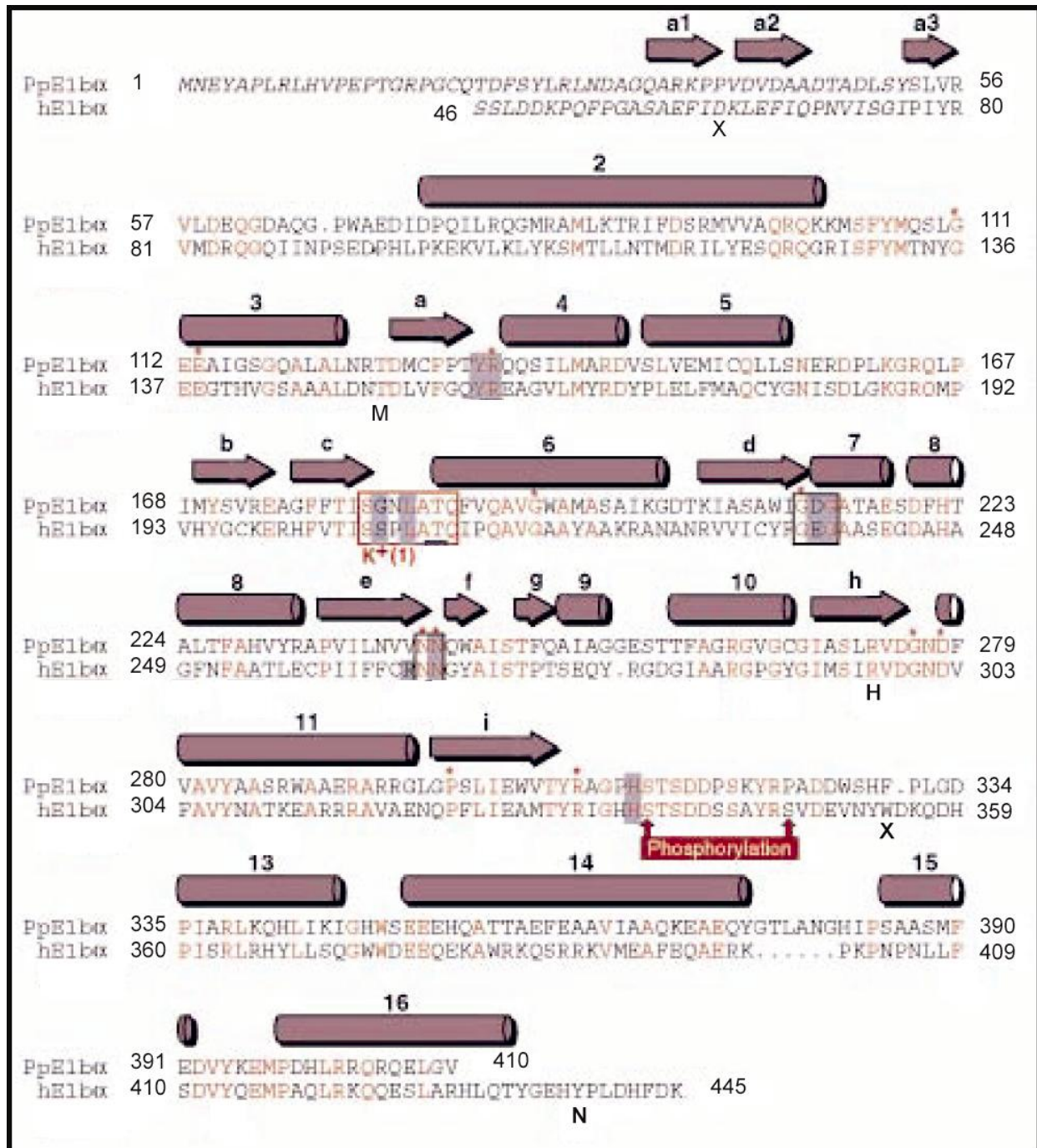


Abbildung 4.1: Sekundärstruktur der E1α-Untereinheit der BCKDH (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*): Die Aminosäurenreste werden durch den Einbuchstabencode für Aminosäuren dargestellt. Dabei stehen rote Buchstaben für Aminosäurenreste, die beim Menschen und bei *P. putida* identisch sind, und schwarze Buchstaben für nicht identische Aminosäurenreste. Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile für α-Helices und Zylinder für β-Faltblätter dargestellt. Ein roter Kasten um die Buchstaben bedeutet, dass

die Aminosäuren, die durch diese Buchstaben dargestellt werden, an der Bindung der Kaliumionen beteiligt sind. Zwei Serinreste, an denen für die Aktivitätssteuerung des Enzyms wichtige Phosphorylierungen vorgenommen werden, sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen werden durch einen Buchstaben unterhalb der Sequenzen angezeigt.

Arg40GlyfsX23

Durch diese Mutation kommt es nach nur 40 Aminosäuren, die der Wildtypsequenz der E1 α -Untereinheit entsprechen, zu einer Änderung des Leserasters und nachfolgend zu einer fehlerhaften Proteinsequenz. Nach weiteren 23 Aminosäuren wird die Translation durch ein neues Stop-Codon abgebrochen. Deshalb fehlen der E1 α -Untereinheit 384 C-terminale Aminosäuren, was ca. 86 % der gesamten Untereinheit entspricht.

Dadurch ist das gesamte Enzym nicht mehr funktionstüchtig, da für die Enzymfunktion unerlässliche Bereiche in der E1 α -Untereinheit liegen (*Ævarsson et al., 2000*). Große Teile der Hauptdomäne werden nicht gebildet. Dies schließt auch die für die Regulation der Aktivität des gesamten Enzyms durch Phosphorylierung notwendigen Serinreste an den Positionen 337 und 347 mit ein. Außerdem fehlt eine für die Zusammenlagerung zum Heterotetramer wichtige C-terminale Domäne, die aus den Aminosäuren 401 bis 445 gebildet wird.

Es ist zu erwarten, dass diese Mutation zu einem äußerst schweren Funktionsverlust des BCKDH-Enzymkomplexes führt und mit dem Phänotyp einer klassischen MSUD assoziiert ist.

Der Patient K.M. mit klassischer MSUD ist heterozygot für diese Mutation. Eine weitere Mutation im *BCKDHA*-Gen, welche auch mit einer klassischen MSUD assoziiert sein müsste, ließ sich nicht finden.

Thr151Met

Die Mutation Thr151Met wurde bei der Patientin J.S. mit intermittierender MSUD-Variante in heterozygoter Form gefunden. Sie wurde bereits bei einem compound-heterozygoten Patienten türkischer Herkunft mit klassischer MSUD beschrieben (*Dursun et al., 2002*).

Threonin 151 liegt in Bezug auf die Sekundärstruktur der E1 α -Untereinheit zwischen der α -Helix 3 und dem β -Faltblatt a, die beide Bestandteil des hydrophoben Kerns der Hauptdomäne der E1 α -Untereinheit sind (*Ævarsson et al., 2000*). Der Verbindungsbereich zwischen diesen beiden Abschnitten besteht aus den Aminosäuren Aspartat 149, Asparagin 150 und Threonin 151, die alle drei hydrophile Reste mit polaren Seitenketten besitzen. Dieser Bereich ist als funktionell hoch konserviert anzusehen, da sich sowohl bei Mensch, Ratte, Maus, und Rind als auch bei *Pseudomonas putida*, an den korrespondierenden Stellen ausschließlich hydrophile Aminosäurenreste mit polaren Seitenketten befinden (*Zhang et al., 1987; Hu et al., 1988; Dariush et al., 1991; Costeas & Chinsky, 1996; Ævarsson et al., 2000*).

Der Austausch von Threonin gegen Methionin mit größerer unpolarer und schwefelhaltiger Seitenkette dürfte Auswirkungen auf die Gesamtkonformation des hydrophoben Kerns der Hauptdomäne der E1 α -Untereinheit und damit letztlich auf die gesamte Enzymaktivität haben. Aus der Beschreibung eines Thr151Met-compound-heterozygoten Patienten mit klassischer MSUD (*Dursun et al., 2002*) ist zu schließen, dass diese Mutation mit einem schweren Verlust der BCKDH-Aktivität assoziiert ist.

Arg297His

Die Mutation Arg297His beeinflusst die Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten des E1-Heterotetramers der BCKDH. Arginin 297 befindet sich nahe der Berührungsfläche der beiden E1 α -Untereinheiten, die zum größten Teil aus der α -Helix 10 beider Untereinheiten gebildet wird. Es bildet ionische Bindungen mit der negativ geladenen Seitenkette von Aspartat 282 und der Seitenkette von Glutamat 327 aus, welche wiederum eine Wasserstoffbrückenbindung mit Alanin 285 eingeht. Nur durch dieses aufwendige Bindungsgeflecht ist eine präzise Positionierung der Helix 10 und damit die Ausbildung der α/α' -Berührungsfläche gewährleistet. **Abbildung 4.2** zeigt die Positionierung von Arginin 297 in der Tertiärstruktur der E1 α -Untereinheit.

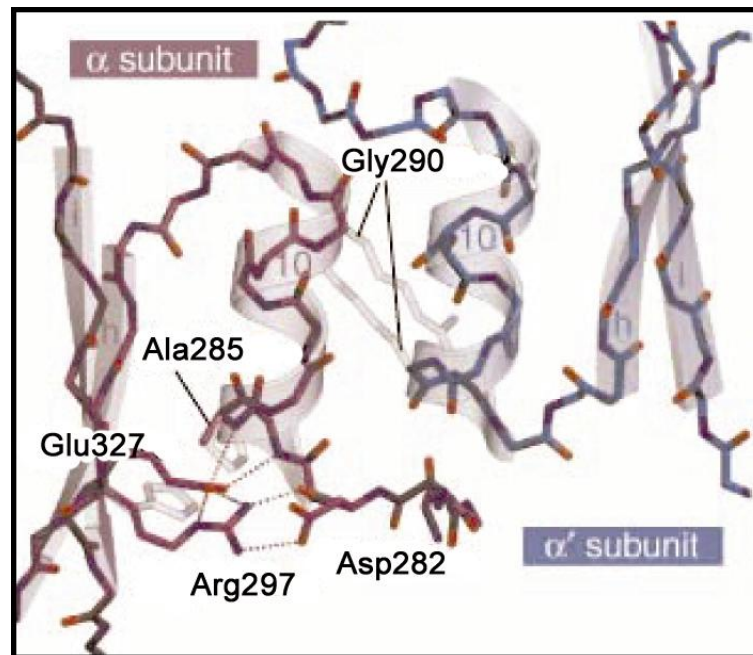


Abbildung 4.2: Positionierung von Arginin 297 in der Tertiärstruktur der E1 α -Untereinheit (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*).

Der Austausch von Arginin gegen Histidin bewirkt an dieser Position eine sehr viel kürzere Seitenkette, welche wahrscheinlich nicht fähig ist, Bindungen mit Aspartat 282 und Glutamat 327 einzugehen. Dadurch kann das aktive Heterotetramer nicht optimal gebildet werden und es kommt nachfolgend zu einer deutlich verminderten BCKDH-Enzymaktivität. Dementsprechend wurde Arg297His im Rahmen dieser Arbeit bei dem Patienten E.H. mit intermediärer/intermittierender MSUD-Variante in homozygoter Form gefunden.

Trp354Stop

Diese Nonsense-Mutation führt nach dem Tryptophan an Position 354 zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation. Dadurch ist die E1 α -Untereinheit um 92 C-terminale Aminosäuren verkürzt. Wie bereits bei der Mutation Arg40GlyfsX23 besprochen, liegen für die Funktion des BCKDH-Komplexes unerlässliche Bereiche in der E1 α -Untereinheit (*Ævarsson et al., 2000*).

Im Rahmen dieser Arbeit fand sich die Mutation Trp354Stop in heterozygoter Form bei der Patientin J.H. mit klassischer MSUD. Bei ihr fand sich eine weitere heterozygote Mutation im gleichen Gen.

Tyr438Asn

Diese Mutation kommt in der Population der Mennoniten in Nordamerika aufgrund eines Gründereffektes mit einer stark erhöhten Prävalenz von 1:176 Lebendgeborenen vor (Marshall & DiGeorge, 1981; Chuang, 1998). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Mutation in heterozygoter Form bei der Patientin J.H. und in homozygoter Form bei dem Patienten N.S. gefunden. Beide Patienten haben eine klassische MSUD.

Die Auswirkungen von Tyr438Asn auf die BCKDH betreffen einen kleinen C-terminalen Bereich, der aus der Hauptmasse der E1 α -Untereinheit herausragt und mit beiden β -Untereinheiten (β und β') des E1-Heterotetramers in Verbindung steht. **Abbildung 4.3** zeigt diese Berührungsfläche.

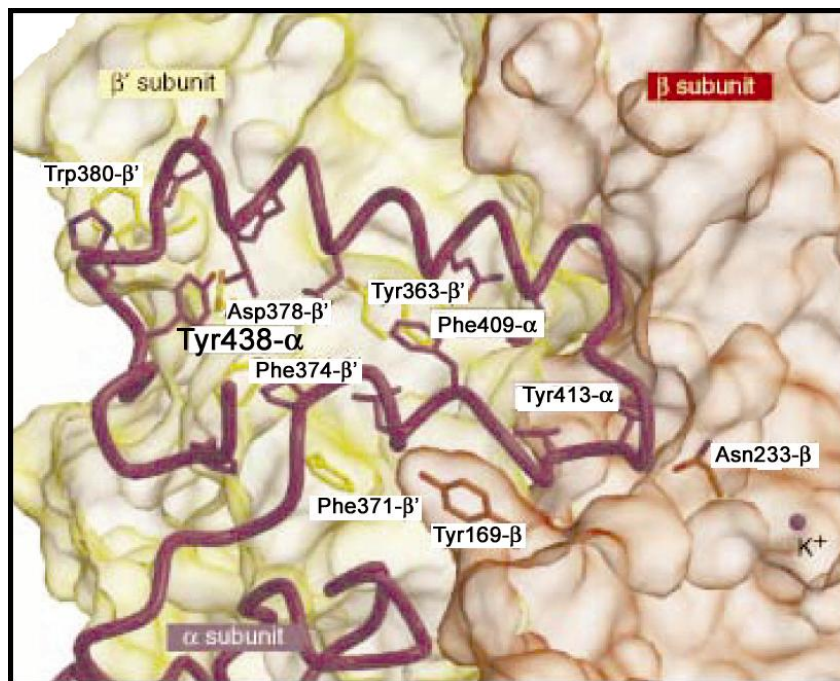


Abbildung 4.3: Lokalisation von Tyr438Asn im Protein (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*): Die E1 α -Untereinheit ist als Kette mit nur wenigen ausgewählten Aminosäureresten dargestellt. Von den E1 β -Untereinheiten ist die Oberfläche halb durchsichtig dargestellt, gelb für die β' -Untereinheit und rot für die β -Untereinheit.

Für die regelrechte Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten werden an dieser Stelle eine Reihe von Aminosäuren mit aromatischen Resten benötigt. Normalerweise liegt Tyrosin an Position 438 eingebettet zwischen Tryptophan 380 und Phenylalanin 374 der β' -Untereinheit und bildet über seine

Hydroxylgruppe Wasserstoffbrückenbindungen zu den Seitenketten von Aspartat 378 (β' -Untereinheit) und Histidin 403 (α -Untereinheit).

Durch den Austausch von Tyrosin durch Asparagin an Position 438 liegt hier nun eine sehr viel kleinere und polare Seitenkette vor, die diese ausgedehnten Wechselwirkungen nicht gewährleisten kann. Dies führt dazu, dass sich die beiden Untereinheiten E1 α und E1 β' nicht zusammenlagern können. Dieser Schritt würde normalerweise am Ende der Zusammenlagerung der vier Untereinheiten zum stabilen E1-Heterotetramer stehen. In **Abbildung 4.4** ist dieser Prozess dargestellt: Die vier Untereinheiten bilden intermediäre Heterodimere $\alpha\beta$ und $\alpha'\beta'$, um sich dann zum aktiven Tetramer zusammenzufügen. Dieser letzte Schritt, in dem das aktive Zentrum des Enzyms erst geformt wird, wird durch die Mutation Tyr438Asn verhindert, da die Kontaktfläche zwischen der α - und der β' -Untereinheit verändert ist (*Wynn et al., 1998; Årvarsson et al., 2000*).

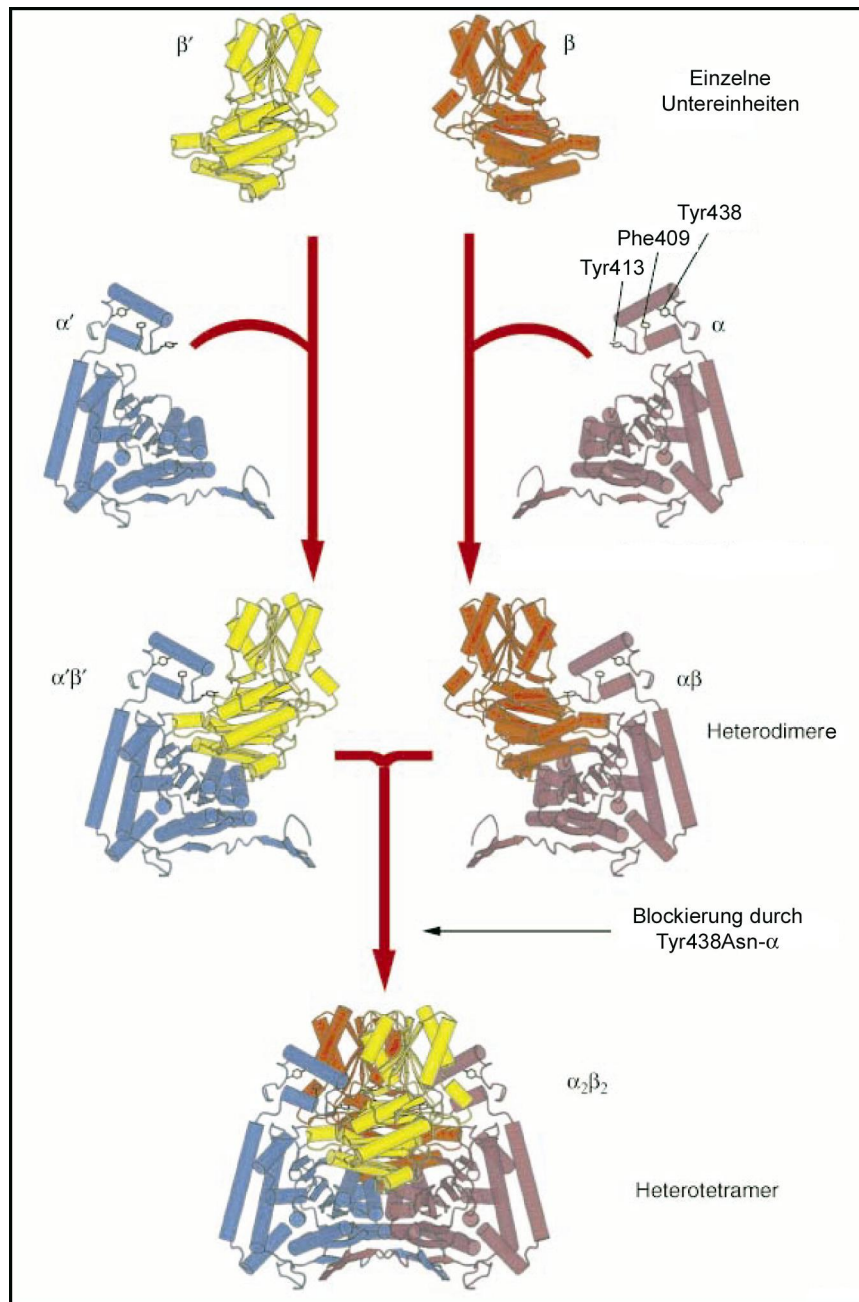


Abbildung 4.4: Prozess der Zusammenlagerung der vier Untereinheiten zum aktiven E1-Heterotetramer und die möglichen Auswirkungen der Mutation Tyr438Asn (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*).

Durch die fehlende Ausbildung des aktiven Zentrums kommt es zu einer stark eingeschränkten Enzymfunktion, welche mit einer klassischen MSUD assoziiert ist.

4.2.2 Mutationen im *BCKDHB*-Gen

Im November 2008 waren im *BCKDHB*-Gen etwa 50 bis 60 Mutationen bekannt (*Chuang et al., 2008*), die auch als Typ-IB-Mutationen bezeichnet werden (*Chuang & Shih, 2001*) und sich aus allen Arten von Genmutationen zusammensetzten. Es ließ sich kein bestimmtes Verteilungsmuster der Mutationen über das Gen beobachten.

In den 28 Allelen des *BCKDHB*-Genlocus der Personen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, fanden sich sieben unterschiedliche Typ-IB-Mutationen auf neun Allelen. Alle sieben Mutationen sind Missense-Mutationen (siehe **Tabelle 3.4**).

Im *BCKDHB*-Gen befinden sich knapp 50 % aller bei dieser Personengruppe gefundenen Mutationen.

Abbildung 4.5 zeigt die Sekundärstruktur der E1 β -Untereinheit des Multienzymkomplexes der BCKDH des Menschen und von *Pseudomonas putida*. Anhand dieser Abbildung und der daraus folgenden Tertiärstruktur des Proteins werden die Mutationen im Folgenden weiter analysiert.

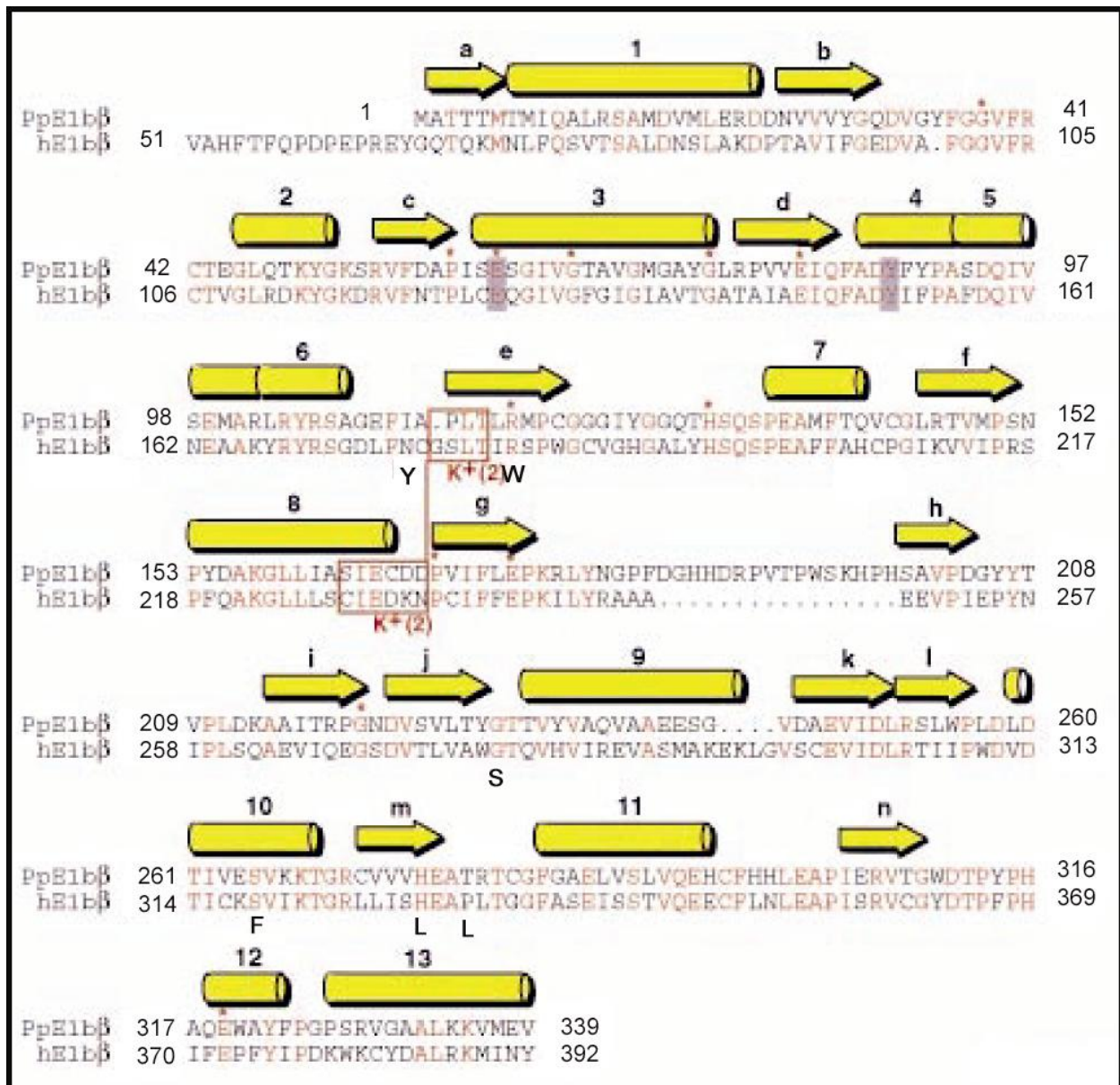


Abbildung 4.5: Sekundärstruktur der E1β-Untereinheit der BCKDH (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*): Die Aminosäurenreste werden durch den Einbuchstabencode für Aminosäuren dargestellt. Dabei stehen rote Buchstaben für Aminosäurenreste, die beim Menschen und bei *P. putida* identisch sind, und schwarze Buchstaben für nicht identische Aminosäurenreste. Die Sekundärstruktur ist durch Pfeile für α -Helices und Zylinder für β -Faltblätter dargestellt. Ein rotes Kästchen um die Buchstaben bedeutet, dass die Aminosäuren, die durch diese Buchstaben dargestellt werden, an der Bindung der Kaliumionen beteiligt sind. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen werden durch einen Buchstaben unterhalb der Sequenzen angezeigt.

Ala39Thr

Diese Mutation wurde in heterozygoter Form als einzige Mutation in den drei krankheitsspezifischen Genen der Patientin J.J. gefunden. Sowohl Alanin als auch Threonin haben aliphatische Seitenketten, die von Threonin ist allerdings länger. Der Austausch dieser Aminosäuren an dieser Position wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Man kann durch Arbeiten über Mutationen im N-terminalen Bereich des *BCKDHB*-Gens allerdings sagen, dass Alanin 39 in der Mitochondrieneintrittsequenz liegt (*Nobukuni et al., 1991*) und im reifen Protein nicht mehr vorhanden sein dürfte (*Ævarsson et al., 2000*). Somit dürfte diese Mutation keine krankheitsverursachende Wirkung haben.

Asn176Tyr

Diese Mutation wurde schon bei einem für diese Mutation compound-heterozygoten MSUD-Patienten beschrieben (*McConnell et al., 1997*). Sie fand sich in der vorliegenden Untersuchung bei dem Patienten J.M. mit noch asymptomatischer MSUD-Variante auch in compound-heterozygoter Form. Die Mutation betrifft die für die Bindung von Kaliumionen zuständige Region in der E1 β -Untereinheit, eine weitere Bindungsstelle liegt in der E1 α -Untereinheit. Asparagin 176 ist an der Ausbildung eines die Bindungsstelle stabilisierenden Netzwerkes von Wasserstoffbrückenbindungen zu den Seitenketten von Glycin 178 und Arginin 168 beteiligt, das in **Abbildung 4.6** dargestellt ist.

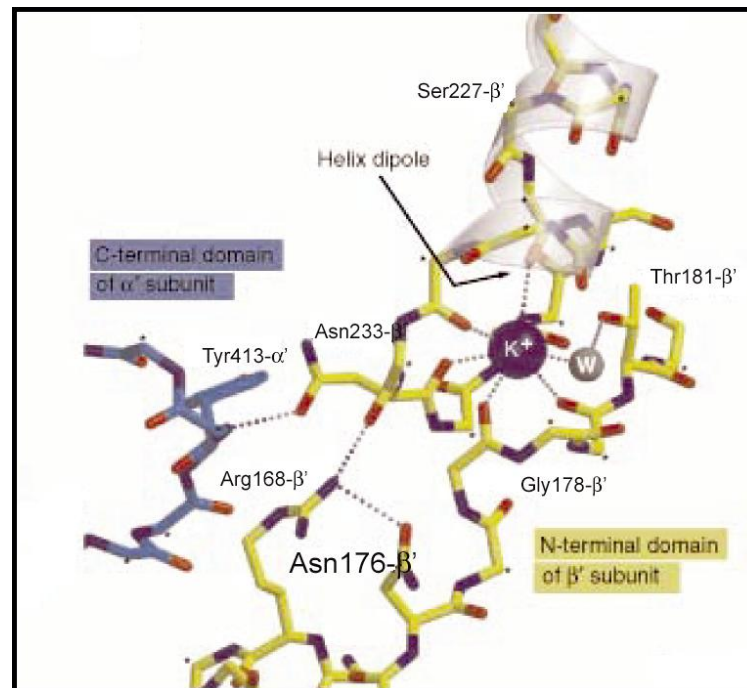


Abbildung 4.6: Bindungsstelle für Kaliumionen in der E1 β -Untereinheit (modifiziert aus *Ævarsson et al.*, 2000).

Die sehr viel größere Seitenkette von Tyrosin beeinträchtigt die Interaktion zwischen Arginin 168 und der Hauptkettencarbonylgruppe von Lysin 232. Dadurch ändert sich die gesamte Stereochemie. Die Hauptkettencarbonylgruppen an den Positionen 178, 231 und 233 können so das Kaliumion nicht mehr binden, was für die Stabilität und Aktivität des Enzyms unerlässlich ist. Die Zusammenlagerung der Untereinheiten ist außerdem beeinträchtigt, da die Seitenkette von Asparagin 233 in engem Kontakt zu der Berührungsfläche zwischen den Untereinheiten steht (*Ævarsson et al.*, 2000).

In homozygoter Form ist diese Mutation mit dem Phänotyp einer klassischen MSUD assoziiert (*McConnell et al.*, 1997).

Arg183Trp

Diese Mutation wurde noch nicht beschrieben, hingegen eine andere Mutation an dieser Position mit Ersatz von Arginin durch Prolin (*Edelmann et al.*, 2001; *Wynn et al.*, 2001). Die Mutation Arg183Pro ist mit dem Phänotyp der klassischen MSUD assoziiert.

Arginin 183 ist in der Mitte des β -Faltblattes e der E1 β -Untereinheit lokalisiert und gilt als konserviert zwischen Mensch und dem Prokaryoten *Pseudomonas putida* (siehe

Abbildung 4.5). Es liegt in enger Nähe (Distanz ca. 10 Å) zu dem Kaliumion, das durch den oben besprochenen Bereich gebunden wird.

Die Seitenkette von Arginin 183 bildet eine Ionenbindung zu der Seitenkette von Glutamat 146 aus. Außerdem bestehen Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zwischen der Aminogruppe von Arginin 183 und der Carboxylgruppe von Alanin 145 in der Hauptkette, als auch zwischen der Carboxylgruppe von Arginin 183 und der Aminogruppe von Isoleucin 147 (Wynn *et al.*, 2001). In **Abbildung 4.7** sind diese Bindungen durch rote Pünktchen dargestellt. Außerdem sieht man hier, dass es durch den Einbau von Prolin (weiß dargestellt) statt Arginin zu einem Knick in der Hauptkette der β -Untereinheit kommt.

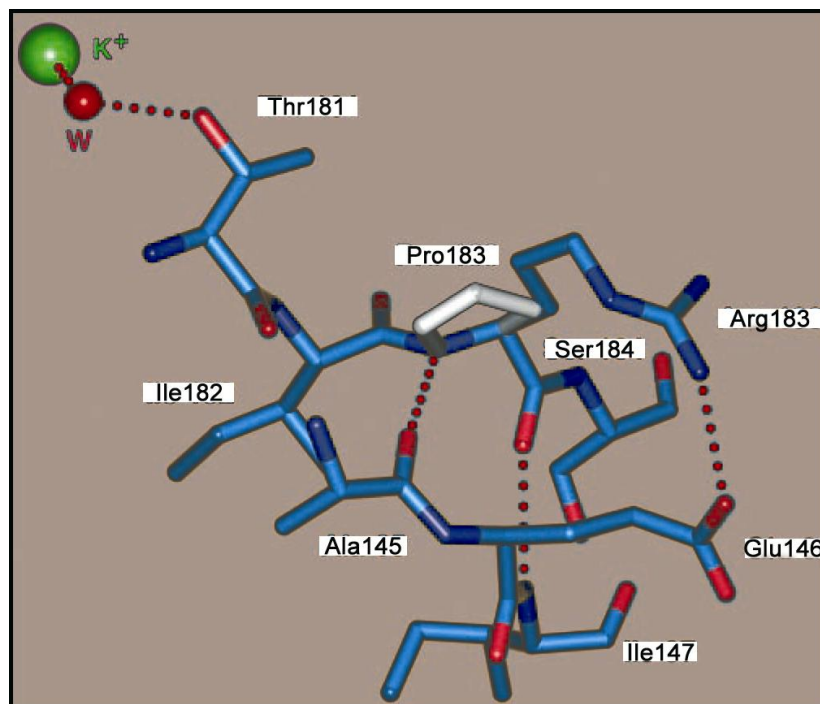


Abbildung 4.7: Wechselwirkungen von Aminosäuren in der E1 β -Untereinheit und Effekt der Arg183Pro-Mutation auf die Struktur (modifiziert aus Wynn *et al.*, 2001).

Es wird vermutet, dass diese veränderte Struktur die Verknüpfung von Arginin 183 mit Alanin 145, Glutamat 146 und Isoleucin 147 unmöglich macht. Dadurch wird die gesamte Interaktion zwischen den verschiedenen β -Faltblättern der E1 β -Untereinheit gestört, und es kommt letztlich zu einer Verdrängung von Threonin 181, das auch im β -Faltblatt e liegt und durch ein Wassermolekül (rotes ‚W‘ in **Abbildung 4.7**) das Kaliumion an der richtigen Position hält. Durch diese strukturellen Veränderungen

kommt es zusätzlich zu einer erhöhten Thermolabilität der E1 β -Untereinheit, die das Protein schon bei physiologischen Temperaturen instabil werden lässt (Wynn *et al.*, 2001). Man kann annehmen, dass es durch den Einbau von Tryptophan mit seiner großen aromatischen Seitenkette an der Position 183 zu ähnlichen Auswirkungen kommt wie durch den Einbau von Prolin. Dies wird dadurch untermauert, dass die für diese Mutation homozygote Patientin I.V. eine klassische MSUD hat.

Gly278Ser

In der Literatur sind Patienten mit varianter bzw. asymptomatischer MSUD beschrieben, die entweder compound-heterozygot für die Mutation Gly278Ser sind (Edelmann *et al.*, 2001; Henneke *et al.*, 2003; Flaschker *et al.*, 2007) oder homozygot (Flaschker *et al.*, 2007). Auch in dieser Arbeit liegt die Mutation bei dem compound-heterozygoten Patienten J.M. mit noch asymptomatischer MSUD-Variante vor. Die andere Mutation im *BCKDHB*-Gen dieses Patienten ist die oben besprochene Mutation Asn176Tyr, die mit einer klassischen MSUD assoziiert ist.

Glycin 278 ist in einer Haarnadelkurve zwischen dem β -Faltblatt j und der α -Helix 9 lokalisiert und gilt als konserviert zwischen Mensch und dem Prokaryoten *Pseudomonas putida* (siehe **Abbildung 4.5**). Die benachbarte Aminosäure Tryptophan 277 ist die letzte Aminosäure des β -Faltblattes j und bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit Glutamat 201. Diese Aminosäure ist wiederum Bestandteil einer hydrophoben „Tasche“, die eine Seite der β/β' -Berührungsfläche ausmacht (siehe **Abbildung 4.8**). Die andere Seite wird durch Histidin 206 der zweiten β -Untereinheit im Heterotetramer gebildet, das sich „wie ein Knopf in das Knopfloch“ der hydrophoben „Tasche“ legt und eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Hauptkettencarboxylgruppe von Threonin 334 ausbildet (Ævarsson *et al.*, 2000).

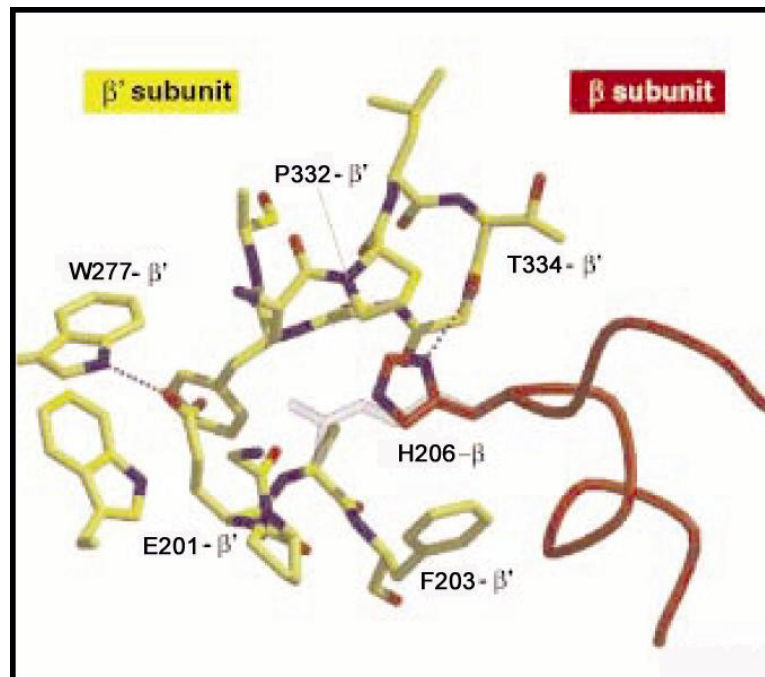


Abbildung 4.8: β/β' -Berührungsfläche (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*).

Die benachbarte Mutation Gly278Ser könnte durch den Austausch der kleinen unpolaren Seitenkette des Glycins durch die größere polare Seitenkette des Serins das Zusammenspiel der E1 β -Untereinheiten während der Zusammensetzung zum Heterotetramer beeinträchtigen und so zu einer herabgesetzten Enzymaktivität führen (*Edelmann et al., 2001*).

Ser318Phe

Diese Mutation wurde in heterozygoter Form bei dem Patienten M.S. mit klassischer MSUD gefunden, der als zweite heterozygote Mutation im *BCKDHB*-Gen His329Leu trägt.

Die Mutation Ser318Phe ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Die Seitenkette von Serin an dieser Stelle gilt als konserviert zwischen Mensch und dem Prokaryoten *Pseudomonas putida* (siehe **Abbildung 4.5**). Serin 318 liegt in der α -Helix 10 und damit im C-terminalen Abschnitt der E1 β -Untereinheit, der zum Bereich der Bindedomäne an die E2-Untereinheit gehört (*Ævarsson et al., 2000*).

Abbildung 4.9 zeigt die Bindung der E2-Untereinheit an das C-terminale Ende der E1 β -Untereinheit des E1-Heterotetramers beim Aufbau des BCKDH-Komplexes.

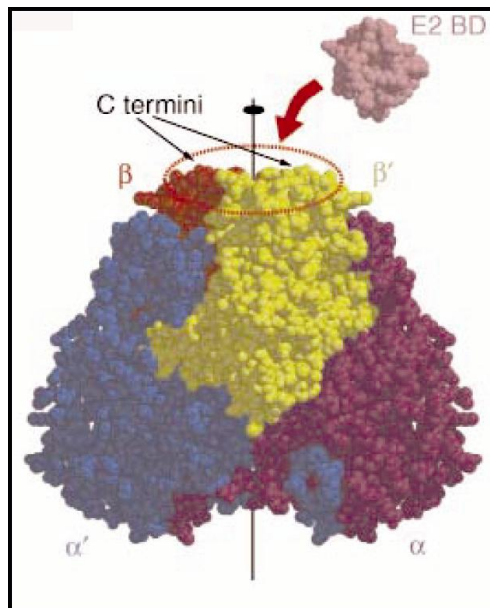


Abbildung 4.9: Aufbau des BCKDH-Komplexes (modifiziert aus *Ævarsson et al., 2000*).

Die strukturellen Veränderungen, die sich durch den Einbau der aromatischen Seitenkette von Phenylalanin statt der aliphatischen Seitenkette von Serin ergeben, greifen damit in ein konserviertes Strukturmotiv und in den Zusammenschluss der E1- und E2-Untereinheiten ein. Es ist anzunehmen, dass die Gesamtkonformation des BCKDH-Komplexes dadurch gestört wird und es zu einer deutlichen Verminderung der Enzymaktivität wie bei einer klassischen MSUD kommt.

His329Leu

Dies ist die zweite heterozygote Mutation am *BCKDHB*-Genlocus des Patienten M.S. mit klassischer MSUD. Bei dieser Mutation kommt es zu einem Einbau von Leucin mit aliphatischer Seitenkette statt Histidin mit aromatischer Seitenkette. Auch diese Mutation ist bisher nicht beschrieben worden. Sie liegt in einem zwischen Menschen und *Pseudomonas putida* konservierten Bereich des β -Faltblattes m (siehe **Abbildung 4.5**). Dieser Bereich gehört ebenso zum C-terminalen Abschnitt der E1 β -Untereinheit und damit zur Bindedomäne der E2-Untereinheit an das E1-Heterotetramer beim Aufbau des BCKDH-Komplexes.

Die Auswirkungen dieser Mutation dürften also ähnlich sein wie die der Mutation Ser318Phe und zusammen führen die beiden Mutationen zu dem Phänotyp einer klassischen MSUD.

Pro332Leu

Bei dem Patienten A.H. mit klassischer MSUD wurde die bisher unbekannte Mutation Pro332Leu in homozygoter Form gefunden.

Prolin 332 bildet zusammen mit Phenylalanin 203 die hydrophobe „Tasche“, die eine Seite der β/β' -Berührungsfläche ausmacht und oben bei der Mutation Gly278Ser besprochen wurde (siehe **Abbildung 4.8**).

Durch die Mutation Pro332Leu wird der heterozyklische Rest von Prolin durch den kleineren aliphatischen Rest von Leucin ersetzt und die „Tasche“ verliert ihre ursprüngliche Konformation. Außerdem könnte es durch die veränderte Stereochemie zu einer Verlagerung von Threonin 334 kommen, so dass die Wasserstoffbrückenbindung nicht mehr ausgebildet wird. Histidin 206 kann so nicht mehr in der genauen Positionierung gehalten werden, die beiden E1 β -Untereinheiten verlieren ihre feste Verknüpfung. Dadurch kann das aktive Heterotetramer nicht gebildet werden, was den Phänotyp einer klassischen MSUD erklären könnte.

4.2.3 Mutationen im *DBT*-Gen

Im November 2008 waren im *DBT*-Gen etwa 50 Mutationen bekannt, die auch als Typ-2-Mutationen bezeichnet werden (*Chuang & Shih, 2001*). Sie setzten sich zwar aus allen Arten von Genmutationen zusammen, aber eine große Zahl betraf Deletionen (*Chuang et al., 2008*). Auch hier ließ sich kein bestimmtes Verteilungsmuster der Mutationen über das Gen beobachten.

Von den 28 Allelen des *DBT*-Genlocus, die in dieser Arbeit untersucht wurden, fanden sich drei unterschiedliche Typ-2-Mutationen auf drei Allelen. Darunter sind zwei Missense-Mutationen und eine Deletion (siehe **Tabelle 3.5**). Damit befinden sich am *DBT*-Genlocus 20 % aller in dieser Arbeit gefundenen Mutationen.

Die E2-Untereinheit der BCKDH des Menschen ist bisher nicht vollständig röntgenkristallographisch untersucht worden. Im Jahr 2006 wurde aber eine Arbeit über die Struktur der E2-Untereinheit beim Rind veröffentlicht, deren Sequenz zu 93 % mit der des Menschen übereinstimmt (*Kato et al., 2006*).

Abbildung 4.10 zeigt die Sekundärstruktur des katalytischen Zentrums der E2-Untereinheit des Multienzymkomplexes der BCKDH beim Rind (E2b_BOVIN) und außerdem die Struktur der entsprechenden Enzyme bei den Bakterien *Escherichia coli*

(E2o_ECOLI) und *Azotobacter vinelandii* (E2p_AZOVI). Anhand dieser Abbildung und der daraus folgenden Tertiärstruktur des Proteins werden die Mutationen im Folgenden weiter analysiert.

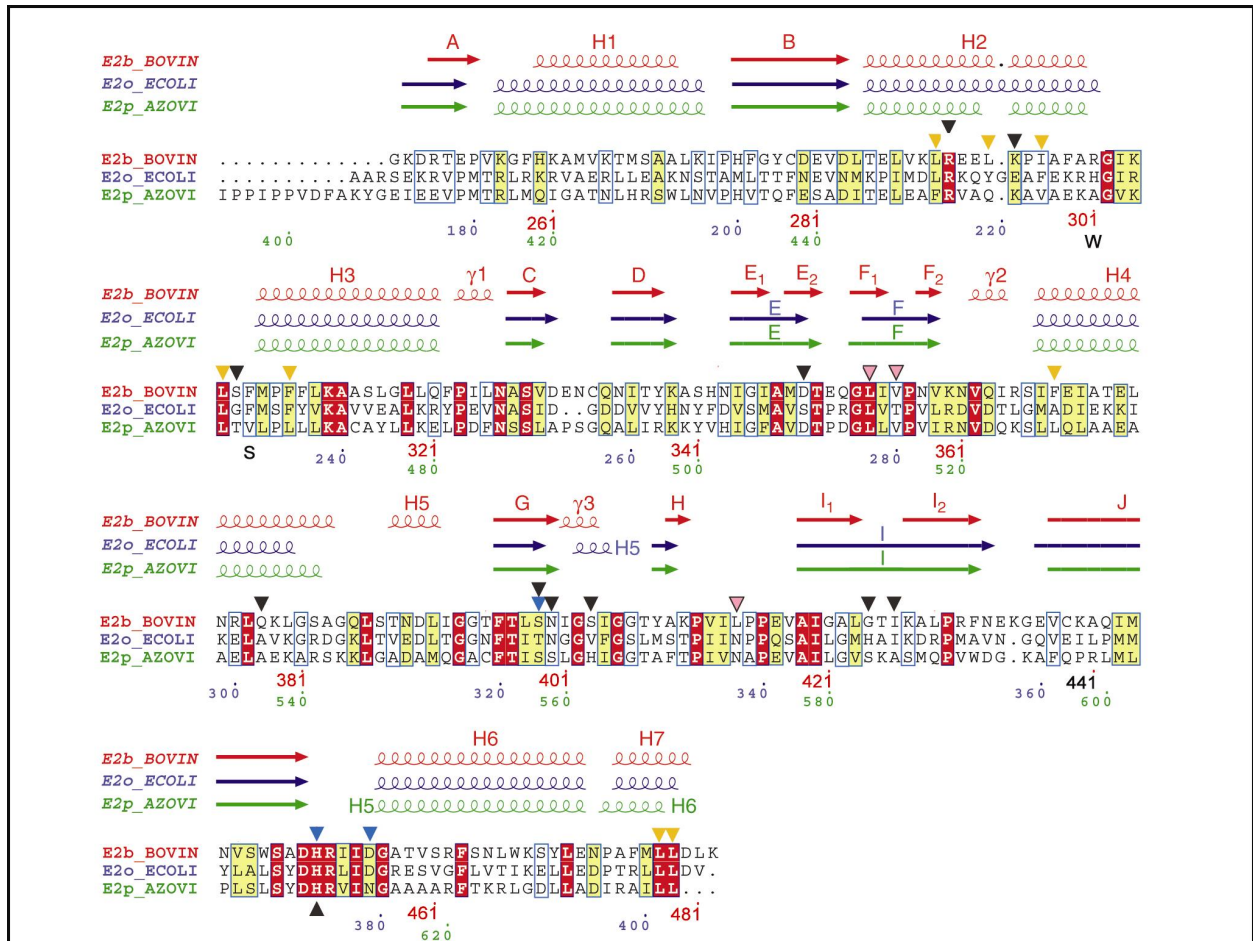


Abbildung 4.10: Sekundärstruktur des katalytischen Zentrums der E2-Untereinheit der BCKDH (modifiziert aus Kato et al., 2006): In der Abbildung werden die Aminosäurenreste durch den Einbuchstabencode für Aminosäuren dargestellt. Dabei stehen Buchstaben in roten Kästchen für Aminosäurenreste, die beim Menschen und den Bakterien identisch sind, Buchstaben in gelben Kästchen für konservierte Aminosäurenreste und Buchstaben in unfarbigen Kästchen für halb-konservierte Aminosäurenreste. Die Sekundärstruktur ist durch Schleifen für α -Helices und Pfeile für β -Faltblätter dargestellt. Die Nummern der Positionen der einzelnen Aminosäuren werden unterhalb der Sequenz angegeben, dabei wurde die Nummerierung der Triplets in der bovinen Sequenz der aktuellen Nummerierung beim humanen Enzym angepasst. Verschiedenfarbige Dreiecke direkt über Aminosäuren geben deren folgende Funktionen im Protein an:

- schwarz: Bindung von Acyl-CoA;
- blau: Aminosäurerest im aktiven Zentrum;
- orange: hydrophobe „Tasche“ für die Interaktion zwischen zwei Trimeren;
- rosa: „Pfortner“ der Dihydrolipoamidbindestelle.

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen werden durch einen Buchstaben unterhalb der Sequenzen angezeigt.

Cys26TrpfsX1

Diese Mutation ist eine von zwei Mutationen der compound-heterozygoten Patientin S.W. mit einer intermittierenden MSUD-Variante.

Diese Mutation ist in der Literatur bereits bekannt und wird mit dem klinischen Phänotyp der klassischen MSUD assoziiert (*Fisher et al., 1993; Henneke et al., 2003; Rodríguez-Pombo et al., 2006*). Dies lässt sich leicht nachvollziehen, wenn man bedenkt, dass es durch das veränderte Lesemuster zu der Bildung eines neuen Stop-Codons und einem dadurch bedingtem Abbruch der Proteinsynthese kommt. Es werden 456 C-terminale Aminosäuren nicht eingebaut, was ca. 95 % der gesamten Untereinheit entspricht. Dadurch ist das gesamte Enzym nicht mehr funktionstüchtig, da die E2-Untereinheit das für die Enzymfunktion unerlässliche Dihydrolipoamid an sich gebunden hat und somit ein wichtiger Bestandteil des BCKDH-Komplexes ist (*Chuang & Shih, 2001*).

Dass die Patientin nicht an einer klassischen MSUD erkrankt war, kann somit nur durch die Mutation, die auf dem zweiten Allel gefunden wurde und mit einer intermittierenden MSUD assoziiert sein muss, bedingt sein.

Arg301Cys

Bei der Patientin J.S. mit intermittierender MSUD-Variante wurde im *DBT*-Gen nur die Mutation Arg301Cys in heterozygoter Form gefunden. Im *BCKDHA*-Gen wurde noch eine weitere heterozygote Mutation identifiziert.

Die Mutation Arg301Cys ist aus der Literatur bekannt und wird mit dem Phänotyp einer Thiamin-responsiven MSUD assoziiert (*Chuang & Shih, 2001*).

Arginin 301 liegt am Ende der zweiten α -Helix und ist beteiligt an der Interaktion zwischen den E2-Trimeren während des Zusammenschlusses von acht Trimeren zum fertigen Homopolymer von 24 E2-Untereinheiten.

Der Zusammenhalt zwischen zwei Trimeren wird durch Ausbildung von diversen Wasserstoffbrückenbindungen und Ionenbindungen zwischen Aminosäurenresten gewährleistet. Die Seitenkette von Arginin 301 bildet dabei eine Ionenbindung zu der

Seitenkette von Aspartat 480 der angrenzenden Untereinheit aus. **Abbildung 4.11** zeigt die Tertiärstruktur an der Berührungsfläche zwischen den Untereinheiten und die Verbindung zwischen Arginin 301 und Aspartat 480'.

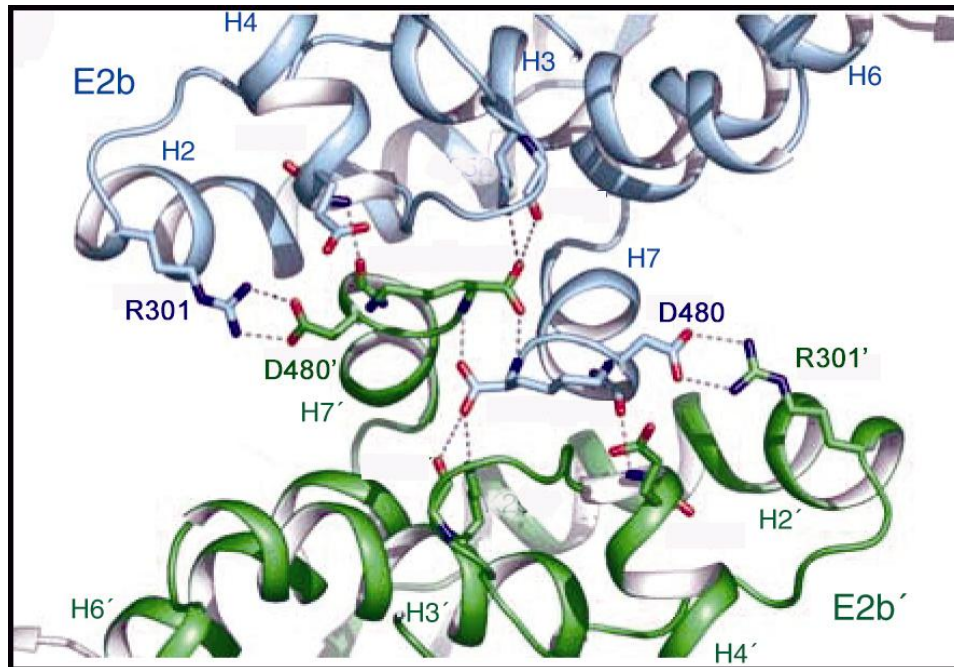


Abbildung 4.11: Berührungsfläche zwischen zwei E2-Untereinheiten (modifiziert aus *Kato et al.*, 2006).

Durch den Einbau der sehr viel kürzeren und schwefelhaltigen Seitenkette von Cystein kann diese Ionenbindung nicht mehr ausgebildet werden. Aus Sedimentationsuntersuchungen weiß man, dass durch die Mutation Arg301Cys zwar nicht die Bildung des Homopolymers verhindert wird, dennoch kann man aufgrund kinetischer Daten der Enzymeigenschaften sagen, dass die Enzymfunktion im Vergleich zum Wildtypenzym eingeschränkt ist (*Kato et al.*, 2006).

Phe307Ser

Phenylalanin 307 liegt am Beginn der dritten α -Helix und gehört zu den halb-konservierten Aminosäuren (siehe **Abbildung 4.10**). Im Wildtypenzym liegt diese Aminosäure in der direkten Nähe der Bindungsstelle für Acyl-CoA, die in **Abbildung 4.12** dargestellt wird.

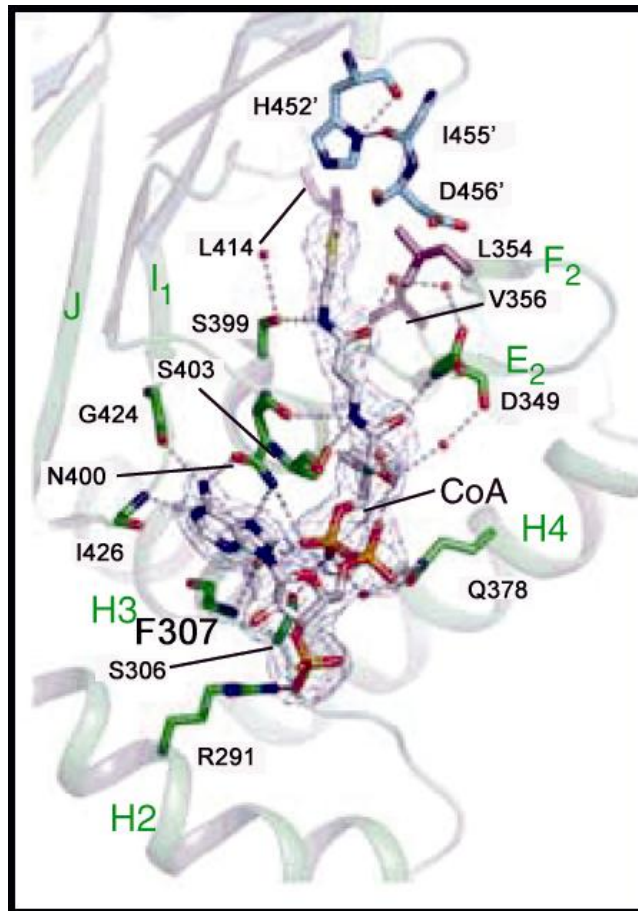


Abbildung 4.12: Sicht auf die Bindungsstelle für Acyl-CoA an der E2-Untereinheit (modifiziert aus *Kato et al., 2006*).

Das infolge der Mutation Phe307Ser eingebaute Serin hat eine sehr viel kürzere und polare Seitenkette als das aromatische unpolare Phenylalanin. Man kann davon ausgehen, dass sich die Gesamtkonfiguration der CoA-Bindestelle dadurch verändert. Die Mutation wurde in heterozygoter Form bei der Patientin S.W. mit intermittierender MSUD-Variante gefunden, auf deren zweiten mutierten Allel sich die Frameshift-Mutation Cys26TrpfsX1 befindet, die zu einem verfrühten Abbruch der Translation und damit zu einer stark verminderten Enzymfunktion führt (siehe oben). Daraus lässt sich schließen, dass die Mutation Phe307Ser mit einem milden varianten Phänotypen assoziiert sein muss.

4.3 *Bedeutung der Mutationsanalytik für die Diagnosestellung der MSUD*

Mit der angewendeten Methode der direkten DNA-Sequenzierung wurde in 16 von 18 möglichen Allelen der krankheitsspezifischen Genloci bei neun MSUD-Patienten, welche letztlich eine MSUD-typische Symptomatik aufwiesen, ein krankheitsverursachendes Mutationseignis aufgedeckt. Dies entspricht einer 90 %-igen Aufklärungsquote. Von den insgesamt zwölf verschiedenen Mutationen waren fünf bereits bekannt, acht Mutationen wurden hier zum ersten Mal beschrieben.

Bei sieben dieser neun MSUD-Patienten wurden jeweils zwei mutierte Allele eines Gens gefunden. Bei dem Patienten K.M. mit klassischer MSUD wurde nur ein verändertes Allel für ein Gen gefunden und bei der Patientin J.S. mit intermittierender MSUD-Variante wurde je ein mutiertes Allel am *BCKDHA*-Genlocus und am *DBT*-Genlocus gefunden. Beides sind bekannte krankheitsverursachende Mutationen - im *BCKDHA*-Gen eine Mutation, die mit einer klassischen MSUD assoziiert ist, im *DBT*-Gen eine, die mit einer als Thiamin-responsiv bezeichneten Variante der MSUD assoziiert ist.

Allerdings ist die genetische Voraussetzung für das Entstehen der MSUD, nämlich das Vorliegen von zwei mutierten Allelen an einem Genlocus bei den Patienten K.M. und J.S. nicht erfüllt. Somit muss es bei ihnen jeweils eine weitere, krankheitsverursachende Mutation an einem der beiden anderen krankheitsspezifischen Genloci geben, die bisher nicht gefunden wurden.

Bei kritischer Betrachtung war bei jedem dieser neun symptomatischen MSUD-Patienten der Einsatz der molekulargenetischen Untersuchung für die Konfirmationsdiagnostik einer MSUD nicht zwingend erforderlich. Allein der sehr hohe Leucinspiegel weit über 1000 µmol/l zusammen mit den hohen Konzentrationen der anderen BCAA einschließlich Allo-Isoleucin und der encephalopathischen Symptomatik können als beweisend für eine MSUD gewertet werden. Bei dem Patienten E.H. mit intermediärer/intermittierender MSUD-Variante, bei dem es erst im Alter von drei Jahren unter katabolem Stress zu einer encephalopathischen Symptomatik kam, konnte allerdings der homozygote Nachweis einer bereits bekannten und mit intermediärer MSUD assoziierten Mutation für eine - in Grenzen - prognostische Aussage zum Schweregrad der MSUD genutzt werden.

Das Ergebnis der molekulargenetischen Analyse der vier bisher asymptomatischen Kinder, die im Neugeborenencreening aufgedeckt wurden, ist ein vollkommen anderes. Von den acht möglichen wurden nur zwei krankheitsverursachende Mutationsereignisse gefunden, beide im *BCKDHB*-Gen bei dem Patienten J.M. Beide Mutationen waren bereits beschrieben. Asn176Tyr wurde als mit klassischer MSUD assoziiert berichtet (*McConnell et al., 1997*) und Gly278Ser als mit einer intermediären MSUD-Variante assoziiert (*Edelmann et al., 2001*). Bei dieser Konstellation ist zu erwarten, dass der klinische Phänotyp durch die letztgenannte Mutation bestimmt wird.

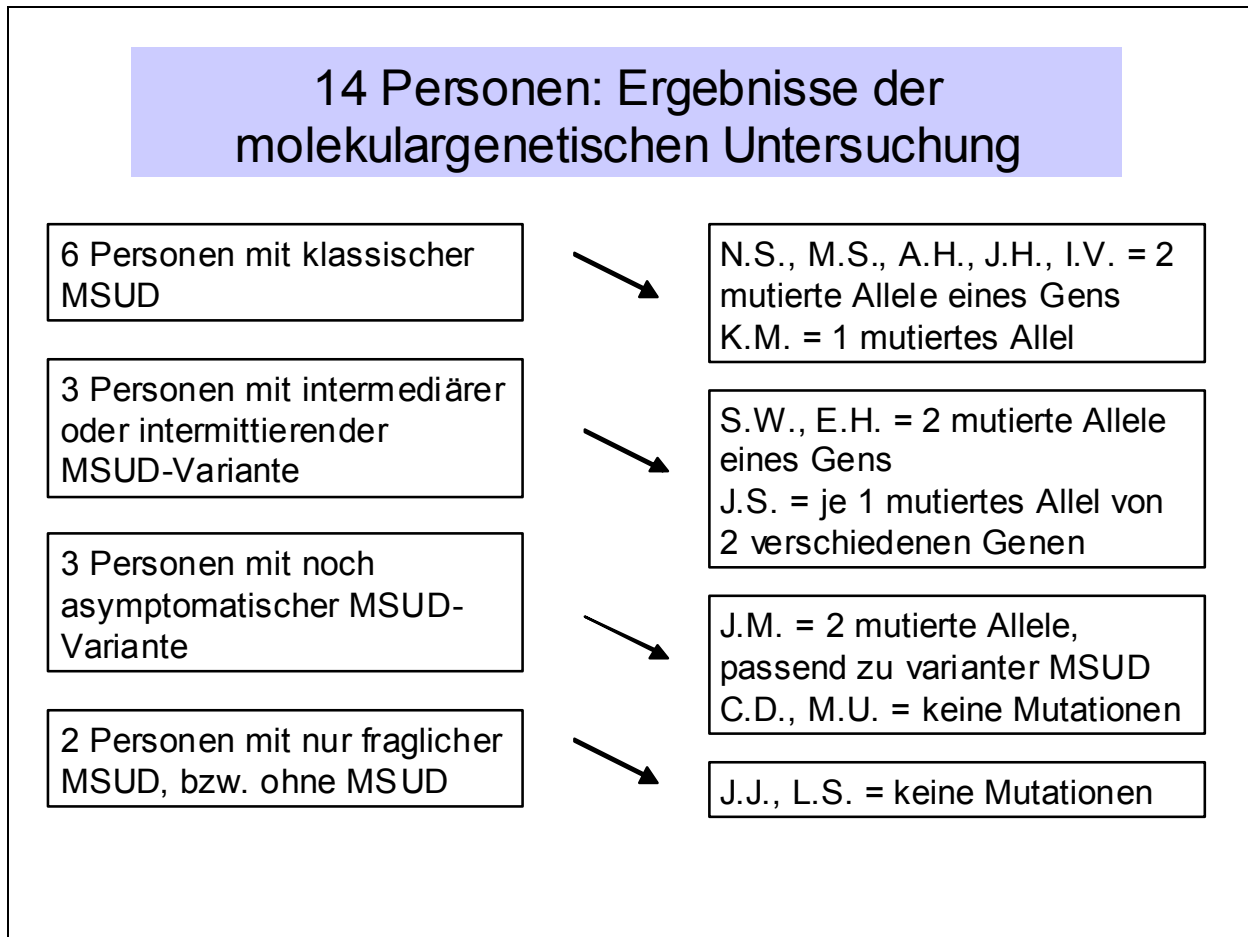
Eine ähnliche funktionell hemizygote Konstellation mit einem Gly278Ser-Allel und einer Stop-Mutation wurde durch die Düsseldorfer Arbeitsgruppe bei einem Patienten mit intermittierender MSUD-Variante berichtet (Patient msud008 bei *Henneke et al., 2003* = Patient 10 bei *Simon et al., 2006a* und bei *Flaschker et al., 2007*). Dieser Patient wies in Fibroblasten eine BCKDH-Restaktivität von 7-9 % auf und zeigte einen intermittierenden Phänotyp mit encephalopathischen Episoden im Alter von drei, vier und sieben Jahren. Drei andere Patienten (Patienten 4, 5 und 14 bei *Simon et al., 2006a* und bei *Flaschker et al., 2007*) hatten die G278S-Mutation entweder in heterozygoter (Patienten 4 und 14) oder homozygoter Form (Patient 5): Die Patienten 4 und 5 wurden im Neugeborenencreening (unter Verwendung eines bakteriellen Hemmtests) erkannt und blieben bis zum Alter von 24 bzw. 25 Jahren asymptomatisch (d.h. sie wiesen keine encephalopathischen Episoden während katabolem Stress auf). Die Restaktivitäten der BCKDH betrugen 19 - 25 %, bzw. 17 % der Norm. Patient 14 zeigte das klinische Bild einer intermittierenden MSUD mit erster encephalopathischer Episode im Rahmen eines katabolen Stress im Alter von 18 Monaten.

Aufgrund der Erfahrung zum genauen Krankheitsverlauf bei Vorliegen der Gly278Ser-Mutation lässt sich bei dem hier untersuchten Patienten J.M. nicht voraussagen, ob sich das Ausbleiben von Symptomen wie in den ersten zweieinhalb Jahren auch in Zukunft während kataboler Stresssituationen fortsetzt oder ob er den Phänotyp einer intermittierenden Form entwickelt. Für den weiteren Verlauf dürften das Ausmaß kataboler Stressreaktionen und der individuelle Umgang des Organismus mit ihnen entscheidend für das Auftreten von MSUD-spezifischen Symptomen sein. Die Beratung der Eltern über den zu erwartenden Verlauf der MSUD muss also entsprechend durchgeführt werden.

Von den anderen Kindern dieser Gruppe verlief die Mutationssuche in den drei strukturellen Genen des BCKDH-Komplexes bei C.D. und M.U. negativ. Die bei dem Kind J.J. gefundene Mutation Ala39Tyr im *BCKDHB*-Gen liegt im Bereich der Mitochondrieneintrittsequenz der E1 β -Untereinheit und dürfte, da im reifen Protein nicht mehr vorhanden, nicht mit einer krankheitsverursachenden Wirkung assoziiert sein. Bei diesem Kind wurden klinisch auch nur fragliche Hinweise auf das Vorliegen einer MSUD gefunden.

Die Mutationssuche bei dem Mädchen L.S., das klinisch einmalig unspezifisch auffällig gewesen war und keine konkreten Hinweise auf das Vorliegen einer MSUD zeigte, verlief in allen drei Genen negativ.

Die Zuordnung der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung aller hier untersuchten Personen werden in der folgenden Abbildung dargestellt:



Die **Tabelle 4.2** fasst für die einzelnen Mutationen die betroffene Funktion des BCKDH-Enzymkomplexes sowie den assoziierten klinischen Phänotyp bzw. die vermutete Auswirkung auf den klinischen Phänotyp zusammen.

Tabelle 4.2: Auswirkungen der gefundenen Mutationen.

<i>Patient</i>	<i>Gen (Exon)</i>	<i>Mutation cDNA</i>	<i>Mutation Protein</i>	<i>Anzahl Allele</i>	<i>Erstbeschreiber, bzw. betroffene Funktion der BCKDH</i>	<i>Assoziierter Phänotyp, bzw. vermutete Auswirkungen</i>
Klassische MSUD						
N.S.	<i>BCKDHA</i> (9)	c.1312T>A	p.Tyr438Asn	2	<i>Matsuda et al., 1990</i>	klassisch
M.S.	<i>BCKDHB</i> (9)	c.953C>T	p.Ser318Phe	1	Bindungsstelle E1 β /E2, Bildung Enzymkomplex beeinträchtigt	schwerer Funktionsverlust
	<i>BCKDHB</i> (9)	c.986A>T	p.His329Leu	1		
A.H.	<i>BCKDHB</i> (9)	c.995C>T	p.Pro332Leu	2	Bindungsstelle E1 β /E1 β ', Bildung Enzymkomplex beeinträchtigt	schwerer Funktionsverlust
K.M.	<i>BCKDHA</i> (2)	c.111delC	p.Arg40GlyfsX23	1	früher Translationsabbruch durch Stop-Codon	schwerer Funktionsverlust
J.H.	<i>BCKDHA</i> (8)	c.1061G>A	p.Trp354Stop	1	Translationsabbruch durch Stop-Codon	schwerer Funktionsverlust
	<i>BCKDHA</i> (9)	c.1312T>A	p.Tyr438Asn	1	<i>Matsuda et al., 1990</i>	klassisch
I.V.	<i>BCKDHB</i> (5)	c.547C>T	p.Arg183Trp	2	<i>Wynn et al., 2001</i> (ähnlich)	klassisch
Intermediäre/Intermittierende MSUD-Varianten						
S.W.	<i>DBT</i> (2)	c.75_76delAT	p.Cys26TrpfsX1	1	<i>Fisher et al., 1993</i>	klassisch
	<i>DBT</i> (7)	c.920T>C	p.Phe307Ser	1	Bindungsstelle für Acyl-CoA	milde Funktions- einbußen
E.H.	<i>BCKDHA</i> (7)	c.890G>A	p.Arg297His	2	<i>Chuang & Shih, 2001</i>	intermediär
J.S.	<i>BCKDHA</i> (4)	c.452C>T	p.Thr151Met	1	<i>Dursun et al., 2002</i>	klassisch
	<i>DBT</i> (7)	c.901C>T	p.Arg301Cys	1	<i>Chuang & Shih, 2001</i>	Thiamin- responsiv

Fortsetzung **Tabelle 4.2:** Auswirkungen der gefundenen Mutationen.

Noch asymptotische MSUD-Varianten						
J.M.	<i>BCKDHB</i> (5)	c.526A>T	p.Asn176Tyr	1	McConnell et al., 1997	klassisch
	<i>BCKDHB</i> (7)	c.832G>A	p.Gly278Ser	1	Edelmann et al., 2001	intermediär
J.J.	<i>BCKDHB</i> (1)	c.115G>A	p.Ala39Thr	1	im reifen Enzym nicht vorhanden	keine Auswirkung

4.4 Mögliche Gründe für negative Ergebnisse der hier durchgeführten Mutationsanalyse

Im Rahmen der molekulargenetischen Untersuchungen zu dieser Arbeit gelang es mit den verwendeten Methoden bei neun Patienten mit MSUD-typischer klinischer Symptomatik (klassische MSUD, intermediäre/intermittierende MSUD-Varianten), in 90 % der Allele die krankheitsverursachende Mutation zu identifizieren. Demgegenüber gelang dies bei drei im Neugeborenencreening erkannten Patienten mit noch asymptotischer MSUD nur in 33 % der Allele. Als potentielle Gründe für diese deutliche Diskrepanz sind verschiedene Aspekte zu diskutieren:

- Die regulatorischen Promotorregionen des *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und des *DBT*-Gens und die zwischen den kodierenden Exonen liegenden Intronbereiche wurden nicht untersucht. Hier können beispielsweise Mutationen vorkommen, die den korrekten Spleißvorgang beeinträchtigen (Chuang & Shih, 2001). Um auch diese Mutationen zu erfassen, müssten die Untersuchungen die Sequenzierung der mRNA beinhalten.
- Bisher wurde die Mutationsanalyse bei der MSUD nicht auf den Genlocus der BCKDH-spezifischen Phosphatase ausgedehnt. Lange Zeit konnte das entsprechende Gen nicht identifiziert werden. Nach neuesten Veröffentlichungen scheint dies gelungen zu sein. Demnach wird die Phosphatase (Protein-Phosphatase 2Cm) durch das *PP2Cm*-Gen = *PPM1K*-Gen kodiert (Lu et al., 2009). Mutationen in diesem Gen, die zu einer Aktivitätsminderung der die

BCKDH aktivierenden Phosphatase führen, könnten vor allem leichteren MSUD-Varianten zugrunde liegen (*Lu et al., 2009*). Das könnte durchaus auch bei den beiden noch nicht molekulargenetisch aufgeklärten Patienten dieser Arbeit mit asymptomatischer MSUD der Fall sein (C.D. und M.U.).

- Als weitere Möglichkeit für die Entstehung leichter MSUD-Varianten wurden veränderte Expressionen von microRNAs angeführt, wodurch es zur Beeinflussung der BCKDH-Aktivität kommen kann. Hier sei vor allem die microRNA29b erwähnt, die sich an die mRNA des *DBT*-Gens bindet und deren Translation verhindert (*Mersey et al., 2005*).

4.5 Zur Diskussion eines Algorithmus für die Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf eine MSUD aus dem Neugeborenenenscreening

In dem Leitlinienentwurf der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen (APS) vom November 2009 mit dem Titel: „Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf angeborene Stoffwechselkrankheiten aus dem Neugeborenenenscreening“ wird auch ein Flussdiagramm zum diagnostischen Algorithmus für die MSUD vorgeschlagen (siehe **Abbildung 4.13**). Dieser soll im Folgenden diskutiert werden.

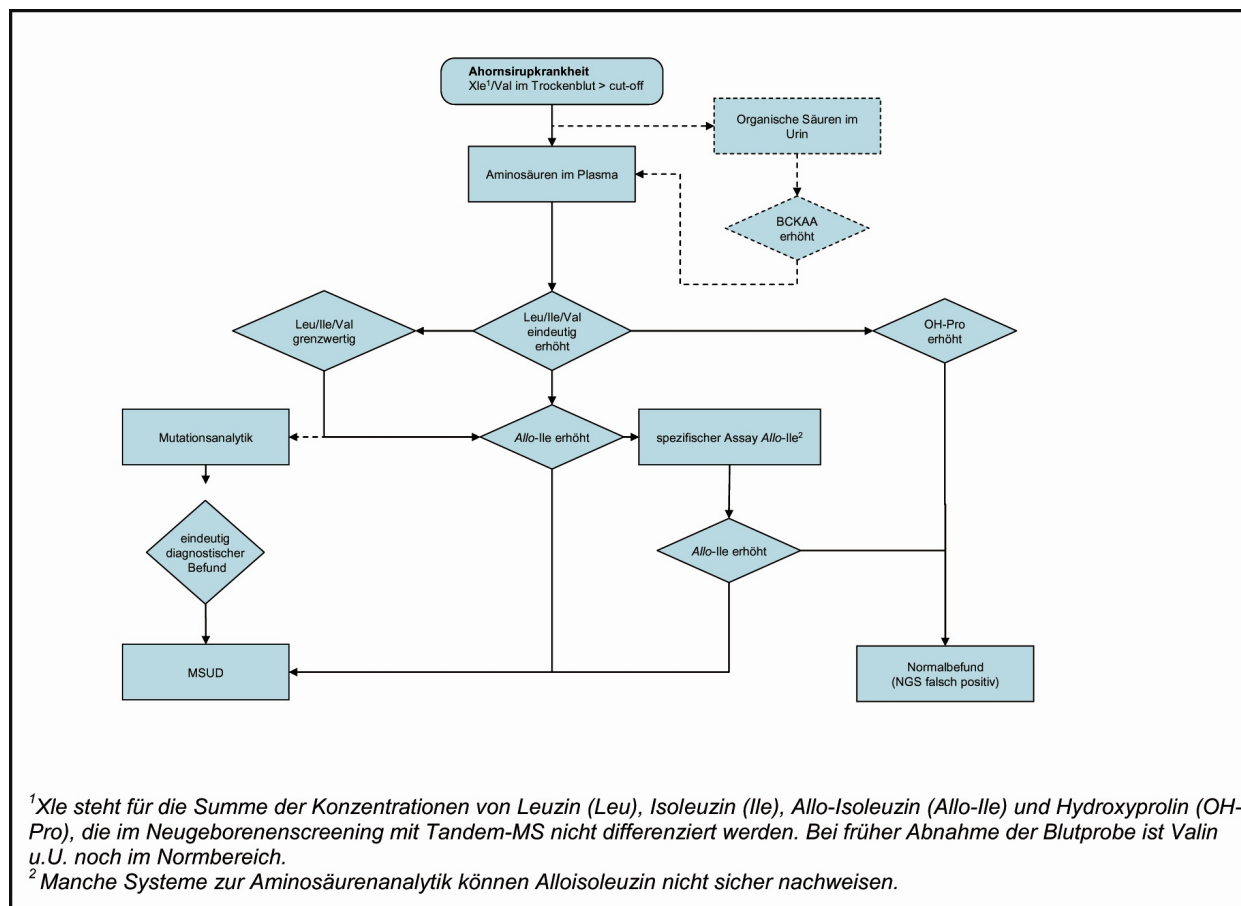


Abbildung 4.13: Flussdiagramm zum diagnostischen Algorithmus für die MSUD.

Durch einen für eine MSUD auffälligen Befund im Neugeborenen Screening wird zunächst nur eine Verdachtsdiagnose gestellt, die durch geeignete Methoden bestätigt oder ausgeschlossen werden muss. Hierzu sind verschiedene Szenarien denkbar. Wenn die Konzentrationen der BCAA und von Allo-Isoleucin im Plasma (und ggf. auch die der BCKA im Urin) deutlich erhöht sind, lässt sich die Diagnose MSUD bereits sicher stellen. Zumindest der Beginn einer typischen klinischen Symptomatik ist bei dieser Konstellation zu erwarten. Weitere Bestätigungsuntersuchungen sind nicht notwendig. Sollte bei der Aminosäurenanalyse im Plasma ein stark erhöhtes Hydroxyprolin auffallen, so kann dies zu einem falsch positiven Ergebnis des Neugeborenen Screenings geführt haben.

Im Falle nur grenzwertig erhöhter BCAA-Spiegel im Plasma ist die Messung der Konzentration von Allo-Isoleucin besonders interessant. Im Falle einer eindeutig erhöhten Allo-Isoleucin-Konzentration, kann die Verdachtsdiagnose als bestätigt gelten. Wenn Zweifel an der Diagnose MSUD bestehen, beispielsweise auch bei asymptomatischen Kindern mit positivem Screeningbefund, sollte eine

Mutationsanalytik durchgeführt werden. Ein eindeutiger diagnostischer Befund (zwei mutierte Allele an einem krankheitsspezifischen Genlocus) bestätigt die MSUD auf der molekulargenetischen Ebene. Ein negativer Befund schließt eine MSUD aber auf Grund der in dieser Arbeit berichteten Ergebnisse nicht aus.

In dem Leitlinienentwurf werden als zu analysierende krankheitsspezifische Gene das *BCKDHA*-, *BCKDHB*-, *DBT*- und *DLD*-Gen aufgeführt, wobei das *DLD*-Gen die E3-Untereinheit des BCKDH-Komplexes kodiert. Bereits in der Einleitung dieser Arbeit wurde angeführt, dass es sich beim genetischen Defekt in der E3-Untereinheit (E3-Defekt) nicht um eine MSUD im eigentlichen Sinne handelt, sondern um ein eigenständiges Krankheitsbild, bei dem zusätzlich zur BCKDH die PDH und α -KGDH von dem genetischen Defekt betroffen sind und Betroffene dementsprechend ein von der MSUD unterschiedliches Metabolitenspektrum aufweisen. Es ist nicht einsichtig, warum dieses Gen bei der Mutationsanalyse im Rahmen der Bestätigungsdiagnostik für MSUD berücksichtigt werden sollte.

Vielmehr schlage ich vor, in die Mutationsanalyse anstelle des *DLD*-Gens das *PPM1K*-Gen aufzunehmen. Die vorliegende Arbeit hat Hinweise darauf ergeben, dass vornehmlich leichten MSUD-Varianten mit langfristig asymptomatischem Verlauf Mutationen im *PPM1K*-Gen zugrunde liegen können. Leider stand das *PPM1K*-Gen zum Zeitpunkt der Laboruntersuchungen zu der vorliegenden Arbeit noch nicht für eine Sequenzanalyse zur Verfügung. Herr Prof. Häberle in Zürich plant aber aufgrund eines Hinweises demnächst bei einer größeren Anzahl von leichten MSUD-Varianten ohne eindeutigen diagnostischen molekulargenetischen Befund Untersuchungen im *PPM1K*-Gen vorzunehmen.

Es gibt Hinweise darauf, dass nach Einführung des Neugeborenen Screenings mittels Tandem-Massenspektrometrie im Vergleich zur Gesamtzahl der neu diagnostizierten Fälle relativ mehr Kinder mit einer leichten, langfristig asymptomatisch verlaufenden MSUD-Variante identifiziert werden (*Fingerhut et al., 2008*). Gerade bei diesen Kindern mit einem vollkommen unvorhersagbaren Krankheitsverlauf (z. B. während kataboler Stressphasen im Verlauf interkurrenter Erkrankungen) sollte die Bestätigungsdiagnostik einer MSUD zweifelsfrei möglich sein. Das geht meiner Ansicht nach nur dadurch, dass bei diesen leichten Varianten das *PPM1K*-Gen in die molekulargenetischen

Untersuchungen eingeschlossen wird. Es wäre auch denkbar, dass die Symptomatik/Krankheit bei einer leichten MSUD-Variante aufgrund mutierter *PPM1K*-Allele anders, eventuell gutartiger verläuft, als aufgrund mutierter *BCKDHA*-, *BCKDHB*- oder *DBT*-Allele. Eine dementsprechende molekulargenetische Untersuchung hätte somit auch eine große prognostische Bedeutung.

V. Zusammenfassung

Die Ahornsirupkrankheit (MSUD) ist eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselstörung, der aktivitätsvermindernde Veränderungen des Multienzymkomplexes der verzweigtkettigen α -Ketosäuren-Dehydrogenase (BCKDH) zugrunde liegen. Dadurch kommt es zu einer Abbaustörung der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) Leucin, Isoleucin und Valin und der zugehörigen α -Ketosäuren (BCKA), welche in den Körperflüssigkeiten und den Geweben akkumulieren. Zusätzlich entsteht auch die für die MSUD pathognomonische Aminosäure L-Allo-Isoleucin.

Der BCKDH-Multienzymkomplex setzt sich aus vier BCKA-spezifischen katalytischen Untereinheiten zusammen. Diese sind die E1- und E2-Untereinheit, eine inaktivierende Kinase und eine aktivierende Phosphatase. Die E1-Untereinheit besteht wiederum aus E1 α - und E1 β -Polypeptiden, welche durch das *BCKDHA*- bzw. *BCKDHB*-Gen kodiert werden. Die E2-Untereinheit wird durch das *DBT*-Gen kodiert, die Kinase durch das *BCKDK*-Gen und die Phosphatase durch das erst kürzlich identifizierte *PPM1K*-Gen. Bisher wurden für die verschiedenen Formen der MSUD über 166 krankheitsverursachende Mutationen beschrieben, die entweder den *BCKDHA*-, den *BCKDHB*- oder den *DBT*-Genlocus betreffen. Alle MSUD-Patienten mit Mutationsnachweis zeichnen sich entweder durch eine Homozygotie der gefundenen Mutation oder eine Compound-Heterozygotie für mutierte Allele an jeweils einem Genlocus aus. In den *BCKDK*- und *PPM1K*-Genen wurde bisher noch nicht systematisch nach krankheitsverursachenden Mutationen gesucht.

Die akkumulierenden verzweigtkettigen Substanzen, insbesondere Leucin und die zugehörige α -Ketoisocaproinsäure (KIC) haben sowohl eine akute als auch eine chronische neurotoxische Wirkung auf das Gehirn. Dieser Wirkung liegen zwei Mechanismen zugrunde. Zum einen bewirkt eine stark erhöhte Plasma-Leucinkonzentration eine kompetitive Transporthemmung für eine Reihe anderer essentieller Aminosäuren an der Bluthirnschranke mit der Konsequenz einer eingeschränkten Protein- und Neurotransmittersynthese im Gehirn. Zum anderen kommt es im Zusammenhang mit einer hohen Konzentration von KIC im Gehirn zu einer Störung des Glutamatstoffwechsels in den Astrozyten und Synaptosomen und

durch Beeinträchtigung des Citratzyklus zu einem Energiemangel. Während ein akuter starker Anstieg der Leucin- und KIC-Konzentrationen, z. B. im Rahmen eines katabolen Stresses, zu einer akuten Encephalopathie führt, kommt es bei langfristig mäßiggradig erhöhten Leucin- und KIC-Konzentrationen zu einer chronischen Hirnschädigung mit Dysmyelinisierung. Zur Vermeidung einer Hirnschädigung benötigen Patienten mit MSUD eine lebenslange Diätbehandlung, durch welche die Plasmakonzentrationen für Leucin und die anderen BCAA in den normnahen Bereich gesenkt werden.

Die MSUD präsentiert sich mit unterschiedlichen Schweregraden. Es wird die schwerste und häufigste klassische Form (mit einer BCKDH-Restaktivität $< 2\text{-}5\%$) von mehreren leichteren varianten Formen mit höherer BCKDH-Restaktivität unterschieden. Zu diesen gehören die intermediäre Form, die bei verspäteter Diagnosestellung eine irreversible neurologische und psychointellektuelle Symptomatik aufweist, die intermittierende Form, bei der es unter katabolem Stoffwechselstress zu sehr gefährlichen encephalopathischen Episoden kommen kann und eine asymptomatisch verlaufende Form, die nur im Neugeborenenenscreening aufgrund relativ leicht erhöhter BCAA-Konzentrationen im Blut erkannt werden kann.

Die Diagnostik der MSUD erfolgte in Deutschland bis zum Jahre 2002 in der Regel aufgrund klinischer Symptome. Seit 2005 wird sie unabhängig von der klinischen Symptomatik im Rahmen des erweiterten Neugeborenenenscreenings (NBS) erkannt. Wie für andere Zielkrankheiten des Neugeborenenenscreenings gilt auch für die MSUD, dass ein positiver Screeningbefund immer nur eine Verdachtsdiagnose und keine definitive Diagnose darstellt. Es muss daher immer eine sichere Bestätigung der Diagnose (oder auch ein sicherer Ausschluss der Diagnose) mit geeigneten Anschlussuntersuchungen im Labor erfolgen. Die frühzeitige Erkennung der MSUD am 4. bis 5. Lebenstag im NBS aufgrund erhöhter Konzentrationen der BCAA im Blut bringt es mit sich, dass das betroffene Neugeborene sich noch im präsymptomatischen Stadium oder zu Beginn des symptomatischen Stadiums befindet. Es können grundsätzlich Neugeborene sowohl mit der klassischen MSUD als auch mit einer MSUD-Variante erkannt werden und eine Behandlung kann frühzeitig erfolgen, noch bevor es zur Ausbildung schwerer und zum Teil irreversibler Störungen des Zentralnervensystems kommt. Der

Algorithmus, nach dem die Bestätigungsdiagnostik zu erfolgen hat, ist bisher nicht verbindlich in einer Leitlinie festgelegt.

Die Laboruntersuchungen der Bestätigungsdiagnostik betreffen grundsätzlich Untersuchungen auf drei Ebenen mit zunehmender Beweiskraft: die Ebene der Stoffwechselmetabolite, die Ebene der Enzymaktivität und die Ebene der Mutationsanalyse krankheitsspezifischer Gene.

Für die Diagnose einer MSUD gelten die stark erhöhten Plasmakonzentrationen von Leucin, Valin, Isoleucin, und - unbedingt - von Allo-Isoleucin als beweisend. In solchen Fällen wird der Nachweis einer reduzierten BCKDH-Aktivität (z. B. in kultivierten Hautfibroblasten) oder die Bestätigung durch Nachweis krankheitsverursachender Mutationen nicht als zwingend erforderlich angesehen. Bei stark erhöhten Plasmakonzentrationen der BCAA ist zum Zeitpunkt der Konfirmationsdiagnostik auch mit neurologischen Symptomen zu rechnen.

Im Falle nur grenzwertig erhöhter BCAA-Spiegel im Plasma ist die Messung der Konzentration von Allo-Isoleucin besonders interessant. Bei einer eindeutig erhöhten Allo-Isoleucin-Konzentration kann die Verdachtsdiagnose als bestätigt gelten. Sollten aber Zweifel an der Diagnose einer MSUD bestehen oder liegen nur grenzwertig erhöhte BCAA-Spiegel vor, so empfiehlt sich die Durchführung der Mutationsanalytik. Dabei ist zu beachten, dass nur ein eindeutiger diagnostischer Befund (= zwei mutierte Allele an einem krankheitsspezifischen Genlocus) eine MSUD auf molekulargenetischer Ebene bestätigt. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass in einigen Fällen mit varianter MSUD keine krankheitsverursachende Mutationen in den Genen für die drei spezifischen Untereinheiten des BCKDH-Komplexes vorliegen. Es wurde spekuliert, dass in solchen Fällen die den BCKDH-Komplex aktivierende Phosphatase genetisch verändert sein könnte.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, mit dem Material von insgesamt 14 Personen, bei denen sich die Verdachtsdiagnose einer MSUD aufgrund der klinischen Symptomatik (N=6) oder aufgrund eines positiven Befundes im Neugeborenenenscreening ergab (N=8), die Bedeutung des Nachweises krankheitsverursachender Mutationen für eine sichere Bestätigung der Diagnose zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden folgende Teilaspekte bearbeitet:

- Zuordnung der im Neugeborenenenscreening identifizierten Fälle von MSUD zu einem von drei klinischen Phänotypen im Vergleich zu klinisch diagnostizierten Fällen.
- Molekulargenetische Charakterisierung hinsichtlich möglicher Mutationseignisse im *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gen bei allen 14 untersuchten Personen.
- Mögliche Konsequenzen der gefundenen Mutationen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der E1- (E1 α - und E1 β -) und E2-Untereinheiten des BCKDH-Multienzymkomplexes.
- Diskussion eines Algorithmus für die Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf eine MSUD aus dem Neugeborenenenscreening.

In einer ersten Analyse wurden die Kinder aufgrund der klinischen Angaben und einschlägigen klinisch-chemischen Daten (Plasmaspiegel der BCAA einschließlich Allo-Isoleucin, Allo-Isoleucin/Isoleucin-Ratio, BCKA-Oxidation in Fibroblasten) zu einem der drei Phänotypen - 1.) klassische MSUD, 2.) intermediäre oder intermittierende MSUD-Variante, 3.) noch asymptomatische MSUD-Variante - zugeordnet. Im Rahmen dieser Zuordnung wurde in der Gruppe der sechs klinisch auffällig gewordenen Patienten ein Kleinkind wegen offensichtlicher Fehldiagnose ausgesondert. Von den restlichen fünf Patienten hatten drei eine klassische MSUD und zwei eine intermittierende MSUD-Variante. Von den acht Kindern mit einem für MSUD positiven Befund im NBS konnten drei sofort einer klassischen MSUD zugeordnet werden, und eins einer intermediären/intermittierenden MSUD-Variante. Vier Kinder liefen anfänglich unter der Verdachtsdiagnose einer asymptomatischen MSUD. Bei einem Kind war diese Verdachtsdiagnose aufgrund fehlender spezifischer Laborbefunde im Rahmen der Konfirmationsdiagnostik nicht haltbar.

Von allen 14 Personen mit anfänglichem MSUD-Verdacht wurde die molekulargenetische Charakterisierung hinsichtlich möglicher Mutationseignisse im *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gen durchgeführt. Zur Charakterisierung der molekulargenetischen Veränderungen wurden die Gene mit den jeweils angrenzenden Intronsequenzen untersucht. Dabei wurden 14 verschiedene wahrscheinlich

krankheitsverursachende Mutationen, davon fünf im *BCKDHA*-Gen, sechs im *BCKDHB*-Gen und drei im *DBT*-Gen nachgewiesen. Die eine Hälfte der Mutationen war bereits bekannt, die andere Hälfte wurde hier zum ersten Mal beschrieben.

Bei den neun Patienten (fünf klinisch diagnostiziert, vier im NBS identifiziert) mit einer MSUD-typischen Symptomatik und mit für eine MSUD eindeutigen klinisch-chemischen Befunden wurden in 16 von 18 möglichen Allelen (90 %) krankheitsverursachende Mutationseignisse aufgedeckt. Für die Sicherung der Diagnose war in allen diesen Fällen der Einsatz der molekulargenetischen Untersuchung streng genommen nicht erforderlich. Bei den vier bisher asymptomatischen Kindern aus dem Neugeborenencreening (mit grenzwertigen BCAA-Plasmaspiegeln) fanden sich von acht möglichen nur zwei (25 %) krankheitsverursachende Mutationseignisse, beide bei einem Patienten, welcher aufgrund der Erfahrungen mit den gefundenen Mutationen entweder weiter symptomfrei bleiben könnte oder den Phänotyp einer intermittierenden MSUD entwickeln könnte. Schließt man das bereits erwähnte asymptomatische Kind aus dem NBS aufgrund des Fehlens eines auch nur leicht erhöhten Allo-Isoleucinspiegels von der Diagnose einer sehr leichten Form einer MSUD aus, so bleiben zwei Kinder, bei denen sich eine MSUD aufgrund der Laborbefunde bestätigen ließ, bei denen aber in den Genen der drei spezifischen Untereinheiten des BCKDH-Komplexes keine krankheitsverursachenden Mutationen identifiziert wurden.

Die Diskussion der Arbeit betrifft mögliche Konsequenzen der identifizierten Mutationen auf die Sekundär- und Tertiärstruktur der E1- ($E1\alpha$ - und $E1\beta$ -) und E2-Untereinheiten des BCKDH-Multienzymkomplexes. Sie beschäftigt sich aber auch mit den Gründen für die geringe Ausbeute der Mutationssuche bei den Kindern mit noch asymptomatischer MSUD. Hier erscheint mir die Ausdehnung der Mutationsanalyse insbesondere bei den leichten MSUD-Varianten auf den Genlocus der BCKDH-spezifischen Phosphatase erforderlich zu sein. Aktivitätsmindernde Mutationen im *PPM1K*-Gen könnten vornehmlich leichten MSUD-Varianten mit langfristig asymptomatischem Verlauf zugrunde liegen. Gerade bei diesen Kindern könnte der Nachweis von Mutationen im *PPM1K*-Gen auch eine prognostische Aussage hinsichtlich des weiteren klinischen Verlaufs ermöglichen, weil bei einem Defekt in der Phosphatase selbst während schwerer gewebskataboler Phasen ein benigner Krankheitsverlauf möglich wäre.

In der Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen für die „Konfirmationsdiagnostik bei Verdacht auf eine MSUD aus dem Neugeborenenenscreening“ sollte bei jedem Fall von nur grenzwertig erhöhten BCAA-Spiegeln ein eindeutiger diagnostischer Befund durch die Mutationsanalytik erzwungen werden. Dazu sollten aus oben genannten Gründen bei Patienten mit noch fehlendem diagnostischen molekulargenetischen Befund im *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Gen auch Untersuchungen im *PPM1K*-Gen vorgenommen werden.

VI. Literaturverzeichnis

Ævarsson A, Chuang JL, Wynn RM, Turley S, Chuang DT and Hol WG (2000): Crystal structure of human branched-chain α -ketoacid dehydrogenase and the molecular basis of multienzyme complex deficiency branched in maple syrup urine disease. *Structure Fold Des* 8:277-291.

Bhattacharya K, Khalili V, Wiley V, Carpenter K, Wilcken B (2006): Newborn screening may fail to identify intermediate forms of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*:29:586.

Chhabria S, Tomasi LG, Wong PW (1979): Ophthalmoplegia and bulbar palsy in variant form of maple syrup urine disease. *Ann Neurol* 6:71-72.

Chicco AG, Adibi SA, Liu WQ, Morris SM, Jr., Paul HS (1994): Regulation of gene expression of branched-chain keto acid dehydrogenase complex in primary cultured hepatocytes by dexamethasone and a cAMP analog. *J Biol Chem* 269:19427-34.

Chuang DT, Hu CW, Patel MS (1983): Induction of the branched-chain 2-oxo acid dehydrogenase complex in 3T3- L1 adipocytes during differentiation. *Biochem J* 214: 177-81.

Chuang JL, Fisher CR, Cox RP, Chuang DT (1994): Molecular basis of maple syrup urine disease: novel mutations at the E1 α locus that impair E1($\alpha_2\beta_2$) assembly or decrease steady-state E1 α mRNA levels of branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *Am J Hum Genet* 55: 297-304.

Chuang DT (1998): Maple syrup urine disease: it has come a long way. *J. Pediatr.* 132, S17-S23.

Chuang DT, **Shih** VE: Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria), in Scriver C et al. (eds) (2001): The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed., Vol. II, McGraw-Hill, New York, Chap.87, pp 1971-2006

Chuang JL, Wynn RM, Chuang DT (2002): The C-terminal hinge region of lipoic acid-bearing domain of E2b is essential for domain interaction with branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase. J Biol Chem 277:36905-36908.

Chuang DT, Wynn RM, Shih VE: Maple Syrup Urine Disease (Branched-Chain Ketoaciduria), in Scriver C et al. (eds) (2008): Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, OMMBID, www.ommbid.com, McGraw-Hill, New York, Chap. 87, revised November 2008

Costeas PA, **Chinsky** JM (1996): Effects of insulin on the regulation of branched-chain α -keto acid dehydrogenase E1 α subunit gene expression. Biochem J 318: 85-92.

Crabb DW, Deaven LL, Luedemann M, Zhang B, Harris RA (1989) Assignment of the gene for the E1 α -subunit of branched chain α -ketoacid dehydrogenase to chromosome 19. Cytogenet Cell Genet 50: 40-1.

Dancis J, Levitz M, Westall RG (1960): Maple Syrup Urine Disease: branched-chain keto-aciduria. Pediatrics 25:72.

Dancis J, Hutzler J, Snyderman SE, Cox RP (1972): Enzyme activity in classical and variant forms of maple syrup urine disease. J Pediatr 81: 312-20.

Danner DJ, Sewell ET, Elsas LJ (1982): Clofibric acid and phenylpyruvic acid as biochemical probes for studying soluble bovine liver branched chain ketoacid dehydrogenase. J Biol Chem 257: 659-62.

Dariush N, Fisher CW, Cox RP, Chuang DT (1991): Structure of the gene encoding the entire mature E1 α subunit of human branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. FEBS Lett 284: 34-8.

Dursun A, Henneke M, Ozgul K, Gartner J, Coskun T, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Demirkol M, Wendel U, Ozalp I (**2002**): Maple syrup urine disease: mutation analysis in Turkish patients. *J Inherit Metab Dis* 25: 89-97.

Edelmann L, Wasserstein MP, Kornreich R, Sansaricq C, Snyderman SE, Diaz GA (**2001**): Maple syrup urine disease: identification and carrier-frequency determination of a novel founder mutation in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Hum Genet* 69: 863-8.

Ensenauer R, Vockley J, Willard JM, Huey JC, Sass JO, Edland SD, Burton BK, Berry SA, Santer R, Grünert S, Koch HG, Marquardt I, Rinaldo P, Hahn S, Matern D (**2004**): A common mutation is associated with a mild, potentially asymptomatic phenotype in patients with isovaleric acidemia diagnosed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 75:1136-1142.

Estivill E, Sanmarti FX, Vidal R, Alvira R, Lizarraga I, Linares J (**1985**): Comb-like rhythm: an EEG pattern peculiar to leucinos. *An Esp Pediatr* 22:123-7

Fisher CR, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP (**1991**): Occurrence of a Tyr393Asn (Y393N) mutation in the E1 α gene of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex in maple syrup urine disease patients from a Mennonite population. *Am J Hum Genet* 49: 429-34.

Fisher CW, Fisher CR, Chuang JL, Lau KS, Chuang DT, Cox RP (**1993**): Occurrence of a 2-bp (AT) deletion allele and a nonsense (G-to-T) mutant allele at the E2 (DBT) locus of six patients with maple syrup urine disease: multiple-exon skipping as a secondary effect of the mutations. *Am J Hum Genet* 52: 414-24.

Fekete G, Plattner R, Crabb DW, Zhang B, Harris RA, Heerema N, Palmer CG (**1989**): Localization of the human gene for the E1 α -subunit of branched chain ketoacid dehydrogenase (BCKDHA) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Cytogenet Cell Genet* 50: 236-7.

Flaschker N, Feyen O, Fend S, Simon E, Schadewaldt P, Wendel U (2007): Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease. *J Inherit Metab Dis*: 30:903-9.

Fingerhut R, Simon E, Maier EM, Hennermann JB, Wendel U (2008): Maple syrup urine disease: newborn screening fails to discriminate between classic and variant forms. *Clinical chemistry* 54:1739-41.

Gemeinsamer Bundesausschuss der Ärzte und Krankenkassen (2005): Beschluss über eine Änderung der Richtlinien des Bundesausschusses der Ärzte und Krankenkassen über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern bis zur Vollendung des 6. Lebensjahres (Kinder-Richtlinien) zur Einführung des erweiterten Neugeborenen Screenings. *Dtsch. Ärzteblatt* 10:1158-1163.

Gorzelany K (2009): Molekulargenetische Charakterisierung türkisch-stämmiger Patienten mit Ahornsirupkrankheit (MSUD) und geografische Verteilung der Mutationssequenzen in der Türkei. Dissertationsschrift aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Hambraeus L, Westphal O, Hagberg B (1972): Ketotic hypoglycaemia associated with transient branched-chain Aminoacidemia. *Acta Paediat. Scand* 61: 81-89.

Held KR, Sternowsky HJ, Singh S, Plettner C, Grüttner R (1976): Intermittierende verzweigtkettige Ketoacidurie bei ketotischer Hypoglykämie: Untersuchung zur Lokalisation des biochemischen Defekts. *Mschr. Kinderklinik* 124:59-65.

Heldt K, Schwahn B, Marquardt I, Grotzke M, Wendel U (2005): Diagnosis of MSUD by newborn screening allows early intervention without extraneous detoxification. *Molecular Genetics and Metabolism* 84:313-316.

Henneke M, Flaschker N, Helbling C, Muller M, Schadewaldt P, Gartner J and Wendel U (2003): Identification of twelve novel mutations in patients with classic and variant forms of maple syrup urine disease. *Hum Mutat* 22:417.

Herring WJ, Litwer S, Weber JL, Danner DJ (1991): Molecular genetic basis of maplesyrup urine disease in a family with two defective alleles for branched chain acyltransferase and localization of the gene to human chromosome 1. *Am J Hum Genet* 48: 342-50.

Hu CW, Lau KS, Griffin TA, Chuang JL, Fisher CW, Cox RP, Chuang DT (1988): Isolation and sequencing of a cDNA encoding the decarboxylase E1 α precursor of bovine branched-chain α keto acid dehydrogenase complex. Expression of E1 α mRNA and subunit in maple-syrup-urine- disease and 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 263: 9007-14.

Jouvet P, Poggi F, Rabier D, Michel JL, Hubert P, Sposito M, Saudubray JM, Man NK (1997): Continuous venoveous haemodiafiltration in the acute phase of neonatal maple syrup urine disease. *J. Inher Metab DIS* 20: 463-472

Kaplan P, Mazur A, Smith R (1997): Transplantation for maple syrup urine disease (MSUD) and methylmalonic acidopathy (MMA). *J Inherit Metab Dis*:20:37.

Kato M, Wynn RM, Chuang JL, Brautigam CA, Custorio M, Chuang DT (2006): A synchronized substrate-gating mechanism revealed by cubic-core structure of the bovine branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex. *EMBO J.* 25(24):5983-94.

Korein J, Sansaricq C, Kalmijn M, Honig J, Lange B (1994): Maple syrup urine disease: clinical, EEG, and plasma amino acid correlations with a theoretical mechanism of acute neurotoxicity. *Int J Neurosci* 79:21-45.

Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Fisher CW, Chuang DT, Cox RP (1991): Localization of the dihydrolipoamide branched-chain transacylase gene (DBT) of the human branched-chain keto acid dehydrogenase complex to chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet* 56: 33-5.

Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M (1997): Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin Chem* 43:2397-2402.

Lu G, Sun H, She P, Youn JY, Warburton S, Ping P, Vondriska TM, Cai H, Lynch CJ, Wang Y (**2009**): Protein phosphatase 2Cm is a critical regulator of branched-chain amino acid catabolism in mice and cultured cells. *J.Clin Invest* 119:1678-87.

Mackenzie DY, **Woolf LI** (**1959**): Maple syrup urine disease: inborn error of metabolism of valine leucine and isoleucine associated with gross mental deficiency. *Br Med J* 1:90.

Mantovani JF, Naidich TP, Prensky AL, Dodson WE, Williams JC (**1980**): MSUD: presentation with pseudotumor cerebri and CT abnormalities. *J Pediatr* 96(2):279-81.

Marshall L, **DiGeorge A** (**1981**): Maple syrup urine disease in the old order Mennonites. *Am J Hum Genet* 33: 139A.

Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrilov D, Rinaldo P (**2007**): Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inherit Metab Dis*: 30:585-92.

Matsuda I, Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Indo Y, Endo F, Asaka J, Harada A (**1990**): A T-to-A substitution in the E1 α subunit gene of the branched chain α -ketoacid dehydrogenase complex in two cell lines derived from Menonite maple syrup urine disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 646-51.

McConnell BB, Burkholder B, Danner DJ (**1997**): Two new mutations in the human E1b subunit of branched chain α -ketoacid dehydrogenase associated with maple syrup urine disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1361. 263–271.

Menkes JH, Hurst PL, Craig JM (**1954**): A new syndrome: progressive familial infantile cerebral dysfunction associated with an unusual urinary substance. *Pediatrics* 14:462-467.

Mersey BD, Jin P, Danner DJ (**2005**): Human microRNA (miR29b) expression controls the amount of branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex in a cell. *Hum Mol Genet* 14:3371-7.

Mikati MA, Dudin GE, Der Kaloustian VM, Benson PF, Fensom AH (**1982**): Maple syrup urine disease with increased intracranial pressure. *Am J Dis Child* 136(7):642-3.

Morris M, Lewis B, Doolan P, Harper H (**1961**): Clinical and biochemical observations on an apparent non-fatal variant of branched-chain ketoaciduria (maple syrup urine disease). *Pediatrics* 25: 72.

Morton DH, Strauss KA, Robinson DL, Puffenberger EG, Kelley RI (**2002**): Diagnosis and treatment of maple syrup disease: a study of 36 patients. *Pediatrics* 109:999-1008.

Nobukuni Y, Mitsubuchi H, Akaboshi I, Indo Y, Endo F, Yoshioka A, Matsuda I (**1991**): Maple syrup urine disease: Complete defect of the E1 beta subunit of the branched chain alpha-ketoacid dehydrogenase complex due to a deletion of an 11-bp repeat sequence which encodes a mitochondrial targeting leader peptide in a family with the disease. *J Clin Invest* 87:1862, 1991.

Nyhan WL, Barshop BA, Ozand PT (**2005**): Maple syrup urine disease (branched-chain oxoaciduria) in *Atlas of Metabolic Diseases*, 2nd ed., A Hodder Arnold Publication, Chap. 24, pp 159-167

Oglesbee D, Sanders KA, Lacey JM, Magera MJ, Casetta B, Strauss KA, Tortorelli S, Rinaldo P, Matern D (**2008**): Second-tier test for quantification of alloisoleucine and branched-chain amino acids in dried blood spots to improve newborn screening for maple syrup urine disease (MSUD). *Clin Chem*:54:542-9.

Parrella T, Surrey S, Iolascon A, Sartore M, Heidenreich R, Diamond G, Ponzzone A, Guardamagna O, Burlina AB, Cerone R et al. (**1994**): Maple syrup urine disease (MSUD): screening for known mutations in Italian patients. *J Inherit Metab Dis* 17:652-60.

Paxton R, Kuntz M, Harris RA (**1986**): Phosphorylation sites and inactivation of branched-chain α -ketoacid dehydrogenase isolated from rat heart, bovine kidney, and

rabbit liver, kidney, heart, brain, and skeletal muscle. Arch Biochem Biophys 244: 187-201.

Podebrad F, Heil M, Reichert S, Mosandl A, Sewell AC, Bohles H (1999): 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone) -the odour of maple syrup urine disease. J Inherit Metab Dis 22: 107-14.

Reed LJ, Damuni Z, Merryfield ML (1985): Regulation of mammalian pyruvate and branched-chain α -keto acid dehydrogenase complexes by phosphorylation/dephosphorylation. Curr Top Cell Regul 27: 41-9.

Rodríguez-Pombo P, Navarrete R, Merinero B, Gómez-Puertas P, Ugarte M (2006): Mutational spectrum of maple syrup urine disease in Spain. Hum Mutat 27:715.

Romero FJ, Ibarra B, Rovira M, Natal A, Herrera M, Segarra A (1984): Cerebral computed tomography in maple syrup urine disease. J Comput Assist Tomogr 8:410-1.

Schadewaldt P, Beck K, Wendel U (1989): Analysis of maple syrup urine disease in cell culture: use of substrates. Clin Chim Acta 184:47-56.

Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (1999): Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. Clin Chem 45:1734-1740.

Scherer SW, Otulakowski G, Robinson BH, Tsui LC (1991): Localization of the human dihydrolipoamide dehydrogenase gene (DLD) to 7q31-q32. Cytogenet Cell Genet 56: 176-7.

Schönberger S, Schweiger B, Schwahn B, Schwarz M, Wendel U (2004): Dysmyelination in the brain of adolescents and young adults with maple syrup urine disease. Mol Genet Metab 82: 69–75.

Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D, Olgemöller K, Mayatepek E, Hoffmann GF (2003): Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. *Pediatrics*: 111(6 Pt 1):1399-406.

Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL (1990): Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and applications to genome project. *Methods Enzymol* 183:252-278.

Shimomura Y, Kobayashi H, Mawatari K, Akita K, Inaguma A, Watanabe S, Bajotto G, Sato J (2009): Effects of squat exercise and branched-chain amino acid supplementation on plasma free amino acid concentrations in young women. *J Nutr Sci Vitaminol* 55:288-91.

Silberman J, Dancis J, Feigin I (1961): Neuropathological observations in maple syrup urine disease: branched-chain ketoaciduria. *Arch Neurol*: 5: 351–63.

Simon E, Flaschker N, Schadewaldt P, Langenbeck U, Wendel U (2006a): Variant maple syrup urine disease (MSUD)-The entire spectrum. *J Inherit Metab Dis* 29:716-724.

Simon E, Fingerhut R, Baumkötter J, Konstantopoulou V, Ratschmann R, Wendel U (2006b): Maple syrup urine disease: favourable effect of early diagnosis by newborn screening on the neonatal course of the disease. *J Inherit Metab Dis* 29(4):532-537.

Simon E, Schwarz M, Wendel U (2007): Social outcome in adults with maple syrup urine disease (MSUD). *J Inherit Metab Dis*:30: 264.

Snyderman SE (1988): Treatment outcome of maple syrup urine disease. *Acta Paediatr Jpn* 30: 417-24.

Strauss KA, Mazariegos GV, Sindhi R, Squires R, Finegold DN, Vockley G, Robinson DL, Hendrickson C, Virji M, Cropcho L, Puffenberger EG, McGhee W, Seward LM,

Morton DH (2006): Elective liver transplantation for the treatment of classical maple syrup urine disease. *Am J Transplant*:6:557.

Suzuki S, Naito H, Abe T, Nihei K (1983): Cranial computed tomography in a patient with a variant form of maple syrup urine disease. *Neuropediatrics* 14:102-3.

Treacy E, Clow CL, Reade TR, Chitayat D, Mamer OA, Scriver CR (1992): Maple syrup urine disease: interrelations between branched-chain amino-, oxo- and hydroxyacids; implications for treatment; associations with CNS dysmyelination. *J Inherit Metab Dis* 15:121-35

Tsuruta M, Mitsubuchi H, Mardy S, Miura Y, Hayashida Y, Kinugasa A, Ishitsu T, Matsuda I, Indo Y (1998): Molecular basis of intermittent maple syrup urine disease: novel mutations in the E2 gene of the branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex. *J Hum Genet* 43: 91-100.

Wendel U, Gamm G, Claussen U (1981): Maple syrup urine disease: alpha-ketoisocaproate decarboxylation activity in different types of cultured amniotic fluid cells. *Prenat Diagn* 1:235-240.

Wendel U, Langenbeck U, Lombeck I, Bremer HJ (1982): Maple syrup urine disease - therapeutic use of insulin in catabolic states. *Eur J Pediatr* 139:172-5.

Wendel U, Langenbeck U, Seakins JW (1989): Interrelation between the metabolism of L-isoleucine and L-allo-isoleucine in patients with maple syrup urine disease. *Pediatr Res*:11-4.

Westall R, Dancis J, Miller S (1957): Maple syrup urine disease. *Am J Dis Child* 94:571.

Williamson JR, Walajtys-Rode E, Coll KE (1979): Effects of branched chain α -ketoacids on the metabolism of isolated rat liver cells. I. Regulation of branched chain α -ketoacid metabolism. *J Biol Chem* 254: 11511-20.

Wynn RM, Davie JR, Chuang JL, Cote CD, Chuang DT (1998): Impaired assembly of E1 decarboxylase of the branched-chain α -ketoacid dehydrogenase complex in type IA maple syrup urine disease. *J Biol Chem* 273: 13110-8.

Wynn RM, Chuang JL, Sansaricq C, Mandel H, Chuang DT (2001): Biochemical basis of type IB (E1 β) mutations in maple syrup urine disease. A prevalent allele in patients from the Druze kindred in Israel. *J Biol Chem* 276: 36550-6.

Yeaman SJ (1986): The mammalian 2-oxoacid dehydrogenase: A complex family. *Trends Biochem Sci* 11: 293.

Zee DS, Freeman JM, Holtzman NA (1974): Ophthalmoplegia in maple syrup urine disease. *J Pediatr* 84:113-5.

Zhang B, Kuntz MJ, Goodwin GW, Harris RA, Crabb DW (1987): Molecular cloning of a cDNA for the E1 α subunit of rat liver branched chain α ketoacid dehydrogenase. *J Biol Chem* 262: 15220-4.

Zinnanti WJ, Lazovic J, Griffin K, Skvorak KJ, Paul HS, Homanics GE, Bewley MC, Cheng KC, Lanoue KF, Flanagan JM (2009): Dual mechanism of brain injury and novel treatment strategy in maple syrup urine disease. *Brain*: 132(Pt 4):903-18.

Zneimer SM, Lau KS, Eddy RL, Shows TB, Chuang JL, Chuang DT, Cox RP (1991): Regional assignment of two genes of the human branched-chain α -keto acid dehydrogenase complex: the E1 β -gene (BCKDHB) to chromosome 6p21-22 and the E2 gene (DBT) to chromosome 1p31. *Genomics* 10: 740-7.

Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF (2001): Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem*: 47:1945-55.

VII. Anhang

Tabelle 7.1: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des *BCKDHA*-Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-temperatur (°C)
1	295	CAGATGGTGCTGGAGTTTGC	CCCTGAAGGATATGAAGGAAG	55
2	319	TGCTTCTGATGCAGGTGGTCTC	ACGTCTATCTGTGCCTCCAC	58
3	212	TGCCTGTCTCCTCTCTGGT	CTACCTGTGTTTGGGCCA	58
4	248	TGTCATTGCCAGCATAA	TTCTTCCAGGAGCAGCATAG	55
5	297	CCACAGGGCTGAACTGTC	GTCCAGGCCTCAGCTCTT	58
6	339	GTGGGTCATGTGAGTGTGAA	ATCATCTCCTTCCCTCCC	55
7	269	CCTCGTGCATGTTCTTATC	ACAGCCACCGTAGCATCTT	55
8	306	ATCCTCCCTCCTGACCC	AGAGCTTGGGAAGGATTGT	55
9	349	AGGAGGAAGCAGGGTCC	CCCAGTCAGCTCCCTCTAA	58

Tabelle 7.2: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des *BCKDHB*-Gens

Exon Nr.	PCR-Produkt-länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing-temperatur (°C)
1	260	CTGCATAGCCTGAGAATTCC	CTGGGACTGCCCACTCGG	58
2	295	CAGCAATTTGCATAATATCTTTC	TGTGGAGCTCAATGGTTAAC	55
3	338	AGAAGTTGAGAAACCTTGATCG	CCCATTGTATGGATGAATTCC	55
4	295	TCTCCATCCCATTATTAGTTTACT	TCAAGTATTGCCGCTACCT	55
5	340	GAGGAAGAACGGAAGGAGAT	AAACAAACAGGATTCTTGAA	55
6	322	GCAGCGAGTTTACTGGGATA	TTGGTATTTAGTTTGTCTCAGG	55
7	249	TTTCCTGTTCTGTATTTAGCGG	AAGTCTGGTCGTA CTGATGCT	55
8	249	AATAGTGACATCAGCATTCAACT	GAAATTGTGAGCTATGTGAGCA	55
9	302	CGAGTTGTAAC TTATTGGCATAC	ACATGCCAATTCCAGAAGAA	55
10	291	TTGCACTATTTCA TTCTGTGAG	CCAAGACACAGCAATCATCA	55

Tabelle 7.3: Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung der genomischen DNA des *DBT*-Gens

Exon Nr.	PCR- Produkt- länge (bp)	Sequenz Primer Sense (5'-3')	Sequenz Primer Sense (3'-5')	Annealing- temperatur (°C)
1	133	CGTTTCCCATCTCCTGATAG	GTGATTTGTCCGGAGTCATC	55
2	301	GAGATAAGCCGGTATGGTTG	GACTGTGTATTTCTAGCCGG	52
3	265	CCTCTGCCTGAGAACATTC	GGATAGTGGGAATCCATTT	52
4	329	CTCAGCATGGCATTACATCCT	TCTCTTTTTGTCATTGGGTCCC	55
5	201	TTCAACTGAAGTTAAGTTTTACC	TCTGAGATTGTATAGGAAGTGTAC	55
6	353	ACTGTCAGTTGATCAAATTCC	GGCAATAGTTCATTTATTTTGG	55
7	260	GGATGAAGAGATTTGAGAATTTAA	CAAAACAAGGCTTGAGTAGGACA	52
8	210	TTGTTTCAAATTCTCTATCCTTTCT	GGGCAAATGTGCTTGTAGAT	55
9	273	GATGGCAGTGAAGGTTGATC	GTCACCTGGCATTGTTC	52
10	197	GTCACCTGGCATTGTTC	GCAAATTCAGGGACTAAACA	52
11	314	GCTTGAGCTCTGAACAAGTG	TAGCTGTGCCAGCACATG	52

Diagnostik der Ahornsirupkrankheit (MSUD) mit besonderer Betrachtung der Mutationsanalyse in den *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Genen

Von Sarah Fend

Der MSUD liegen unterschiedliche vererbte Defekte in jeweils einer der drei Untereinheiten (E1 α , E1 β , E2) des BCKDH-Multienzymkomplexes zugrunde. Als Folge einer BCKDH-Aktivitätsminderung akkumulieren die verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) Leucin, Valin, Isoleucin und pathognomonisches Allo-Isoleucin. Außer der schwersten klassischen Form der MSUD gibt es leichtere symptomatische (intermediäre und intermittierende) Varianten sowie eine sehr leichte, über lange Zeit asymptomatisch verlaufende Variante. Bisher fanden sich bei allen Formen der MSUD > 170 krankheitsverursachende Mutationen im *BCKDHA*- (kodiert für E1 α), *BCKDHB*- (kodiert für E1 β) oder *DBT*-Gen (kodiert für E2).

Seit einigen Jahren werden alle Formen der MSUD im erweiterten Neugeborenencreening (NBS) im prä- bzw. früh-symptomatischen Stadium erkannt. Der klinische Verdacht auf MSUD und ein positiver Screeningbefund bedürfen der Konfirmationsdiagnostik. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des Nachweises krankheitsverursachender Mutationen für die Diagnosesicherung der MSUD mit dem Material von 14 Personen (6 mit klinisch gestellter Verdachtsdiagnose, 8 mit positivem NBS-Befund) untersucht. Bei 9 Personen mit MSUD-typischer Symptomatik und hoch-pathologischen MSUD-beweisenden Laborbefunden wurden in 16 von 18 möglichen Allelen (90%) krankheitsverursachende Mutationen aufgedeckt. Davon waren 7 Mutationen neu: 2 im *BCKDHA*-, 4 im *BCKDHB*- und 1 im *DBT*-Gen. Zur Sicherung der Diagnose war in allen diesen Fällen die molekulargenetische Diagnostik nicht zwingend erforderlich. Von vier Kindern aus dem Neugeborenencreening mit asymptomatischen Verlauf und nur grenzwertig erhöhten BCAA-Plasmaspiegeln war bei einem die Diagnose MSUD aufgrund des Fehlens spezifischer Laborbefunde (einschließlich normales Allo-Isoleucin) nicht haltbar. Bei den anderen 3 Kindern mit nur sehr leicht pathologischen aber eindeutigen Laborbefunden (einschließlich erhöhtem Allo-Isoleucin) fanden sich von 6 möglichen nur 2 (33%) krankheitsverursachende Mutationereignisse, beide bei einem Kind, welches aufgrund der Erfahrungen mit den beiden im *BCKDHB*-Gen gefundenen Mutationen entweder weiterhin symptomfrei bleiben oder während eines katabolen Stresses den Phänotyp einer intermittierenden MSUD-Variante entwickeln könnte.

Aufgrund der Ergebnisse wird gefordert, dass bei positiv gescreenten Kindern mit asymptomatischem Verlauf und nur grenzwertig erhöhten BCAA-Spiegeln die Diagnosesicherung einer MSUD durch Mutationsanalytik erfolgen sollte. Dabei sollte außer den *BCKDHA*-, *BCKDHB*- und *DBT*-Genen auch das *PPMIK*-Gen sequenziert werden, welches für die spezifische BCKHD-aktivierende Phosphatase kodiert. Es gibt zunehmend Hinweise dafür, dass bei leichten MSUD-Varianten aktivitätsmindernde Mutationen im *PPMIK*-Gen mit eigenständigem klinischem Verlauf vorliegen könnten.

Univ.-Prof. Dr. med. Udo Wendel

Veröffentlichung

- Flaschker N, Feyen O, Fend S, Simon E, Schadewaldt P, Wendel U (2007): Description of the mutations in 15 subjects with variant forms of maple syrup urine disease. J Inherit Metab Dis: 30:903-9.

Danksagung

Als erstes möchte ich mich äußerst herzlich bei Herrn Professor Wendel bedanken, der mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat und jederzeit zu Erläuterungen bereit war. Dies ist die letzte von ihm betreute Arbeit und er war stets erreichbar, hat nie die Geduld verloren und mich immer mit sehr guten Vorschlägen unterstützt. Einen besonderen Dank auch für die zeitnahe Durchsicht des Manuskripts.

Bei Herrn Professor Rieder möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Korreferats bedanken.

Den kooperierenden Ärzten danke ich sehr für die Bereitstellung des Materials und Herrn Professor Häberle in Zürich für die weitere Bearbeitung der Proben.

Martina Müller gilt mein besonderer Dank, da sie mir das Arbeiten im Labor beigebracht und zu einer Freude gemacht hat. Sie stand mir stets unkompliziert und mit bewundernswerter Ausdauer bei Fragen und Problemen zur Seite und dies nicht nur mit Herz und Verstand, sondern auch mit Pfälzer Dialekt. Zum Dank gibt es lebenslang persönliche Betreuung!

Ohne meine Laborkollegin und gute Freundin Kerstin wäre die Laborarbeit und auch das restliche Studium nicht das Gleiche gewesen. Die gemeinsame Zeit in der Uni und nebenher ist durch die feste Zusammenarbeit und unsere gemeinsame Wellenlänge einzigartig geworden. Vielen Dank hierfür!

Meiner Familie verdanke ich ein sorgenfreies Studium und ich möchte mich von ganzem Herzen dafür bedanken, dass jeder Einzelne stets an mich geglaubt hat. Sie waren nicht nur für mich da, wenn wieder Gene nach Mutationen durchforstet werden mussten oder ich einen Korrekturleser brauchte, sondern stellen auch eine unendlich wichtige, nichtfachliche Unterstützung dar.

Und ohne Sönke hätte mir nicht nur ein hilfreicher Ratgeber während der gesamten Erstellung dieser Arbeit gefehlt, sondern auch ein sehr wichtiger Teil meines Lebens.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher noch von keiner medizinischen Fakultät abgelehnt.

Ich bin mir darüber klar, dass der Bruch der obigen Eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, dass die Fakultät die Promotion widerruft.

Lebenslauf

Name	Sarah Fend
Geburtsjahr	1983

Ausbildung

06/2002	Abitur
10/2002 - 12/2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Düsseldorf
12/2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen)

Beruf

06/2009 - 11/2009	Assistenzärztin in der Neurologischen Klinik am Städtischen Klinikum Karlsruhe
seit 04/2010	Assistenzärztin in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie am Städtischen Klinikum Karlsruhe

Karlsruhe, Oktober 2010